



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Raumzeitliche Dynamik der Aktivität neuronaler Populationen im visuellen Kortex der Katze

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Sebastian Vögler

aus Kassel

1. Referent: Prof. Dr. Ralf A. W. Galuske

2. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube

Tag der Einreichung: 04.03.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2014

Darmstadt, 2014

D 17

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Zusammenfassung.....	6
4	Einleitung.....	8
4.1	Das visuelle System	9
4.2	Die Retina und ihre Projektionen	10
4.2.1	Vom CGL zum Cortex	12
4.2.2	Der visuelle Kortex.....	13
4.2.3	Kolumnäre Organisation des primären visuellen Kortex.....	16
4.2.4	Modulationen neuronaler Aktivität im visuellen Kortex	18
4.2.5	Der visuelle Thalamus.....	18
4.3	Der posteromediale laterale suprasylvische Kortex (PMLS)	21
4.4	Voltage Sensitive Dye Imaging	23
4.5	Spontanaktivität	25
4.6	Motivation der Studie	27
4.7	Arbeitshypothese	28
5	Methoden.....	29
5.1	Operativer Eingriff	29
5.1.1	Anästhesie und Medikamentation	29
5.1.2	Chirurgischer Eingriff	30
5.2	VSD Imaging.....	32
5.2.1	Visuelle Stimulation.....	32
5.2.2	Experimente	33
5.2.3	Der Farbstoff.....	35
5.2.4	Das Imaging	36
5.2.5	Synchronisation	38

5.3	Elektrophysiologische Ableitung	39
5.4	Exkurs: Technische Aspekte des VSD Imagings	40
5.5	Datenanalyse	44
5.5.1	Analyse der optischen Daten.....	44
5.5.2	Auswertung der Experimente Phase 1	47
5.5.3	Auswertung der Experimente Phase 2	51
5.5.4	Elektrophysiologie	52
5.5.5	Statistik	56
5.5.6	Histologie.....	56
6	Ergebnisse.....	58
6.1	Ergebnisteil: Experimente Phase 1	58
6.1.1	Visuell evozierte Aktivität in Area 18	58
6.1.2	Validierung der optischen Karten.....	59
6.1.3	Das ICA Modell	60
6.1.4	Anwendung der ICA auf physiologische Daten	64
6.2	Ergebnisteil: Experimente Phase 2	68
6.2.1	Single Trial Variabilität trotz bester technischer Voraussetzungen	68
6.2.2	Analyse der Spontanaktivität	69
6.2.3	Analyse der Trial-to-Trial Variabilität	75
6.3	Histologie.....	85
7	Diskussion.....	87
7.1	Die Beseitigung von Artefakten.....	87
7.1.1	Independent Component Analyse.....	87
7.1.2	Die Vermeidung von Artefakten.....	88
7.1.3	Modernisierung der Aufnahmetechnik.....	88
7.2	Analyse der Trial-to-Trial Variabilität	89
7.3	Raumzeitliche Muster der Spontanaktivität	91
7.4	Spontanaktivität und kortikale Oszillationen	92

7.5	Mechanismen der Variabilität von neuronalen Antworten	93
7.6	Alpha-Oszillationen und Aufmerksamkeit.....	95
7.7	Alpha-Oszillationen und Inhibition.....	96
7.8	Modelle zur Modulation der kortikalen Erregbarkeit im Alpharhythmus	98
7.9	Einfluss höherer Areale auf die Aktivität in Area 18	101
7.10	Ursprung der Interaktionen im Alphaband	102
7.11	Top-down gesteuerte Modulationen im interarealen Kontext.....	103
7.12	Thalamo-kortikale Netzwerke und Aufmerksamkeit	104
7.13	Synthese und Ausblick.....	105
8	Literaturverzeichnis.....	107
9	Publikationen.....	116
10	Lebenslauf	117
11	Danksagung	118
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	120

2 Abkürzungsverzeichnis

CCD	Charge-coupled Device
CGL	Corpus geniculatum laterale
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
Cs	Colliculi superiores
EEG	Elektroenzephalografie
EKG	Elektrokardiogramm
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FEF	Frontales Augenfeld
FFT	Schnelle Fourier-Transformation
fMRI	Funktionelle Magnetresonanztomographie
ICA	Independent Component Analyse
IPL	Lobulus parietalis <i>inferior</i>
IPS	Intraparietaler Sulkus
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
LFP	Lokales Feldpotential
MEG	Magnetoencephalographie
MHZ	Megahertz
MT	Middle temporal
MUA	Multi-Unit-Aktivität
PCA	Principal Component Analyse
PMLS	Posteromedialer lateraler suprasylvischer Kortex
QE	Quantum Efficiency
SEF	Supplementary Eye Field
SNR	Signal-to-Noise-Ratio
SPL	Lobulus parietalis superior
TMS	Transkranielle Magnetstimulation
TRN	Nucleus reticularis thalami
TTL	Transistor-Transistor-Logik
VSD	Voltage Sensitive Dye
VSDI	Voltage Sensitive Dye Imaging

3 Zusammenfassung

Die Großhirnrinde stellt beim Säuger einen wichtigen Bereich des Zentralnervensystems dar, der sich mit der Verarbeitung von sensorischen Informationen befasst. Anatomisch ist diese Struktur durch ihren kolumnären Aufbau gekennzeichnet. Diese Kolumnen oder Zellsäulen sind hoch spezialisierte neuronale Entitäten, die z.B. im visuellen Kortex hoch spezialisiert einzelne Aspekte visueller Stimuli analysieren und repräsentieren. Zum Verständnis der neuronalen Mechanismen, die der Verarbeitung sensorischer Informationen zugrunde liegen, ist es allerdings von großer Bedeutung, nicht nur Signale von einzelnen Orten in der Großhirnrinde zu sammeln, sondern neuronale Aktivität großflächig und simultan über weite Bereiche eines Rindenareals abzuleiten. Dies lässt sich sehr gut mit optischen Ableitverfahren bewerkstelligen. Besonders die Methodik des Voltage Sensitive Dye Imagings (VSDI) ist für solche Zwecke prädestiniert, denn mit dieser Methode können simultan die Aktivität tausender Neurone im visuellen Kortex der Katze in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung visualisiert werden.

Während der Datenanalyse hat sich herausgestellt, dass die Antwortstärke auf einen Stimulus trotz konstanter Versuchsbedingungen sehr stark variieren kann. Dies ist sowohl auf der Basis von elektrophysiologisch gewonnenen Daten der Fall wie auch auf der Basis von optischen Ableitungen aufgefallen. Um zu überprüfen, ob diese Variationen zumindest in den optisch gewonnenen Daten auf Störeinflüsse durch Artefakte resultierend aus den Kreislauffunktionen des Versuchstieres, wie z.B. dem Herzschlag der Katze, wurden die Daten mit Hilfe einer Independent Component Analyse (ICA) von Artefakten bereinigt. Durch Einsatz der ICA konnte insbesondere das Herzschlagartefakt beseitigt und die Datenqualität signifikant erhöht werden.

Die Variationen innerhalb der neuronalen Antwortstärke waren jedoch weiterhin feststellbar. Um zu überprüfen, ob diese Variationen auf technische Störsignale zurückzuführen sind, wurden die das VSDI beeinflussenden Störsignale untersucht und durch die Integration eines neuen Aufnahmesystems minimiert. Zu diesem Ziel wurde das bisherige CCD-basierte Kamerasystem auf ein CMOS Kamerasystem gewechselt. Wie sich dann zeigte, konnte nach weitgehender Beseitigung aller biologischen und Minimierung aller technischen Störquellen die Variationen innerhalb der optischen Daten trotz konstanter Versuchsbedingungen weiterhin festgestellt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die Variationen neuronalen Ursprungs sind und auf Schwankungen innerhalb der neuronalen Spontanaktivität zurückzuführen sind.

Die raum-zeitliche Analyse der Spontanaktivität hat ergeben, dass spontan Aktivitätsmuster auftreten, die den entsprechenden Mustern der evozierter Aktivität sehr stark ähneln.

Unabhängig von diesen Mustern war zu beobachten, dass auch die Aktivitäten innerhalb der Spontanaktivität variieren - Phasen hoher und Phasen geringer Spontanaktivität konnten identifiziert werden. Da die Aktivität innerhalb der spontanen- und der evozierten Aktivität variiert, wurde untersucht, ob die neuronale Spontanaktivität innerhalb des primären visuellen Kortex die Stimulus evozierte Aktivität der Neurone beeinflusst. Es ließ sich zeigen, dass während Phasen hoher Spontanaktivität die Antwort auf den Stimulus signifikant erhöht und während Phasen geringer Spontanaktivität signifikant erniedrigt ist. Zurückzuführen sind diese Ergebnisse auf den Erregungsgrad der Neurone kurz vor Beginn der Stimulation.

Nach der Hypothese von Romei und Lange (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013) wird die Erregbarkeit kortikaler Neurone von der oszillatorischen Aktivität im Alphaband stark beeinflusst. Die Hypothese besagt, dass während Phasen hoher Alphaaktivität die kortikale Erregbarkeit reduziert ist. Da es noch keinen direkten Beweis für diese Hypothese gibt, habe ich sie mit Hilfe meiner Daten überprüft. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung der VSD-Daten war es möglich, den Erregungsgrad der Neurone und die vorherrschende oszillatorische Power im Alphaband zeitgleich zu visualisieren. Simultan zu den optischen Daten wurde die Alphaaktivität innerhalb der elektrophysiologisch abgeleiteten Daten in Area 18 und im posteromedialen lateralen Teil des suprasylvischen Kortex (PMLS) gemessen. Die Analyse hat ergeben, dass während Phasen geringer Spontanaktivität und somit eines niedrigem kortikalen Erregungsgrads die Alphaaktivität in Area 18 und in PMLS signifikant erhöht ist. Diese Daten liefern somit zum ersten Mal den direkten Nachweis zur Bestätigung der Hypothese (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013), dass während Phasen hoher Alphaaktivität die Erregbarkeit kortikaler Neurone reduziert ist.

Weiterführend erbrachte eine Kohärenzanalyse den Nachweis, dass eine Interaktion zwischen den neuronalen Netzwerken in Area 18 und PMLS besteht. Die Kohärenz zwischen beiden Arealen ist während Phasen hoher Alphaaktivität hoch (>0.5) und die Berechnung der Phasenverschiebung ergab, dass die Alphaaktivität von PMLS ausgeht. Die Daten liefern einen Hinweis auf eine top-down gesteuerte Modulation der neuronalen Erregbarkeit im primären visuellen Kortex.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Variationen innerhalb der optischen Daten im Wesentlichen nicht auf biologische oder technische Störeinflüsse zurückzuführen sind, sondern neuronalen Ursprungs sind. Das Ausmaß der Spontanaktivität kurz vor Einsatz der Stimulation beeinflusst die Amplitude der evozierten Aktivität durch den Stimulus. Die Spontanaktivität wiederum ist abhängig von der oszillatorischen Aktivität im Alpha-Band, die vermutlich durch top-down gesteuerte Prozesse moduliert wird.

4 Einleitung

Um in einer komplexen Umgebung wie der unseren zu überleben, ist es wichtig, dass unbeachtete, aber saliente sensorische Einflüsse unsere Aufmerksamkeit auf sich ziehen können. Als Beispiel wird eine alltägliche Situation herangezogen: Während des Autofahrens fokussiert man seine Aufmerksamkeit vor allem auf den Gegenverkehr der linken Straßenseite, die eigene Spur wird weit weniger beachtet. Läuft nun plötzlich ein großer Hund auf die eigene Spur, ist man dennoch in der Lage, darauf zu reagieren (Jensen et al., 2012). In humanen MEG und EEG Studien konnte gezeigt werden, dass durch Fokussierung der räumlichen Aufmerksamkeit Stimuli niedriger Salienz (geringer Intensität), präsentiert im unbeachteten Gesichtsfeld, hingegen nicht detektiert werden können. Dieses Phänomen wird als aufmerksamkeitsabhängige Blindheit bezeichnet. In diesem Kontext möchte ich ein weiteres Beispiel anführen (Hanslmayr et al., 2011). Von Zeit zu Zeit können auch saliente sensorische Einflüsse nicht verarbeitet werden, wenn das Gehirn mit anderen kognitiven Prozessen beschäftigt ist. In der Fußgängerzone sieht man eventuell eine vorüberlaufenden alten Freund nicht, weil man an eine attraktive Passantin denkt, der man einen Moment zuvor begegnet ist. Die visuelle Wahrnehmung ist davon abhängig, ob das Gehirn aktuell darauf eingestellt ist, visuelle Informationen zu prozessieren („alter Freund“) oder aber, ob es mit einer internen Repräsentation („attraktive Passantin“) beschäftigt ist. Die unterschiedlichen Zustände, in welchen sich das Gehirn in einem entsprechendem internen oder externen Modus befindet, werden als *brain states* bezeichnet.

Die angeführten Beispiele repräsentieren Situationen, in welchen die Wahrnehmung in Abhängigkeit vom *brain state* variiert. In meinen Experimenten konnte ich feststellen, dass trotz konstanter Versuchsbedingungen auch die neuronalen Antworten auf einen dargebotenen Stimulus Variationen unterliegen. Diese Variationen werden nachfolgend als *Trial-to-Trial* Variabilität bezeichnet, wobei das Wort *Trial* das Synonym für eine einzelne Aufnahmesequenz ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist das Studium dieser Variabilitäten und das Aufspüren der zugrunde liegenden Mechanismen.

In der Einleitung wird zunächst das visuelle System vorgestellt und anschließend wird darauf eingegangen, welche möglichen Quellen für die Variabilitäten innerhalb der neuronalen Aktivität im primären visuellen Kortex verantwortlich sein könnten. Mögliche Modulatoren der evozierten Aktivität im visuellen Kortex sind der visuelle Thalamus, höhere kortikale Areale oder neuronale Spontanaktivität.

4.1 Das visuelle System

Um einen kurzen Überblick über das visuelle System zu vermitteln, wird der Vorgang des Sehens zunächst in einer kurzen Zusammenfassung beschrieben und anschließend kapitelweise detailliert vorgestellt.

Das Licht aus der uns umgebenden Welt tritt durch die Linse des Auges und wird von den Photorezeptoren der Retina in Form von Photonen aufgenommen. Die Photorezeptoren verändern aufgrund des Lichteinfalls ihr Antwortverhalten und leiten die visuellen Informationen über ein Netzwerk aus Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen an die retinalen Ganglienzellen weiter. Der wichtigste Pfad der visuellen Prozessierung ausgehend von der Retina verläuft über den *Corpus geniculatum laterale* (CGL) des Thalamus zum primären visuellen Kortex. Visuelle Informationen werden im Kortex hierarchisch über zwei visuelle Pfade verarbeitet (*Abbildung 1*), der eine verläuft ventral („Was Pfad“), der andere dorsal („Wo Pfad“). Die hierarchisch niederen Areale analysieren zunächst einfache Attribute der Umgebung wie Orientierung, Kontrast, Farbe und Bewegung. Die Resultate dieser Analysen werden über *feedforward* Verbindungen an die nächste Hierarchieebene weitergeben, wo die Informationen integriert werden. Konturen werden nun zusammengesetzt und als Form erkannt, Objekte können vom Hintergrund diskriminiert und deren Bewegung im Raum lokalisiert werden (dorsaler Pfad). In den Arealen höchster Ordnung (ventraler Pfad) werden Objekte wie Gesichter oder Gegenstände schließlich bewusst wahrgenommen.

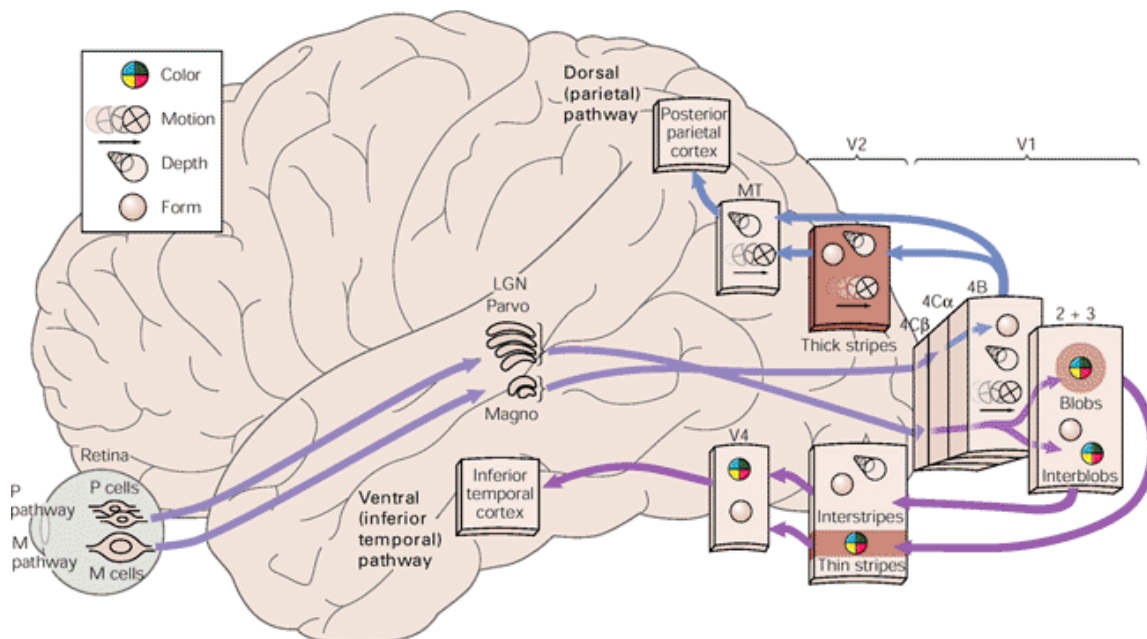


Abbildung 1: Das visuelle System

Schematische Darstellung des dorsalen und ventralen visuellen Pfades ausgehend von der Retina (Kandel et al., 2000). Die Symbole repräsentieren die visuellen Stimuli, auf welche die Nervenzellen im jeweiligen Areal reagieren. (LGN = Nucleus geniculatum laterale; MT = middle temporal)

Der beschriebene unidirektionale Informationsfluss von hierarchisch niederen zu hierarchisch höheren Arealen wird als *bottom-up* Prozess bezeichnet. Unsere Wahrnehmung beruht aber nicht nur auf der reinen Verarbeitung externer physikalischer Parameter, sondern wird ebenfalls durch unsere Erfahrungen, Erwartungshaltungen und die Aufmerksamkeit beeinflusst (Gilbert and Sigman, 2007, Gilbert and Li, 2013). Der Einfluss von internen Informationen auf unsere Wahrnehmung erfolgt über Modulationen der neuronalen Aktivität in hierarchisch niederen Arealen durch Areale höherer Ordnung und wird als *top-down* Prozesse bezeichnet. Die anatomischen Verbindungen, die dieser wechselseitigen Kommunikation zugrunde liegen, werden als *feedforward* oder *feedback* Verbindungen bezeichnet.

4.2 Die Retina und ihre Projektionen

In der Retina von Primaten und Mensch können morphologisch 3 Ganglienzelltypen unterschieden werden, die magnozellulären M-Zellen, die parvozellulären P-Zellen und die „non-M non-P Zellen“. Die Zellen des M-Typs bilden ca. 5% aller Ganglienzellen, sie haben aufgrund ihrer großen rezeptiven Felder eine geringe räumliche Auflösung und antworten phasisch auf Bewegungen und Stimuli mit niedrigem Kontrast. Die Zellen des P-Typs sind mit 94% die zahlenmäßig häufigsten Ganglienzellen in der Retina, sie haben aufgrund ihrer kleinen rezeptiven Felder eine hohe räumliche Auflösung und antworten tonisch auf Stimulusmerkmale wie Form und Farbe von Objekten. Von der Retina ausgehend gibt es drei retinofugale Pfade (Kandel et al., 2000, Bear et al., 2008).

1. Die am stärksten ausgeprägte Projektion (Pfad 1) erfolgt über den CGL zum primären visuellen Cortex. Ausgehend von der Retina unterteilen sie sich in zwei parallele Verarbeitungspfade für Bewegung (M-Typ) und für Form, Farbe und Konturen (P-Typ).
2. Der 2. Pfad projiziert über die Area pretectalis zum Nucleus Westphal-Edinger, welcher den Pupillenreflex über den Musculus sphincter pupillae steuert und somit den Lichteinfall am Auge kontrolliert.
3. Der 3. Pfad ist die retinotectale Projektion zu den *Colliculi superiores* (CS) des Mittelhirndachs.

Neben den Afferenzen der Retina erhalten die CS über Rückprojektionen Informationen aus dem visuellen Kortex und dem frontalen Augenfeld (FEF). Die CS projizieren auf die paramediane pontine *Formatio reticularis*, welche über motorische Neurone die laterale Augenbewegung steuert und die Fovea zur Fixation eines Reizes ausrichtet. In der Peripherie der Retina sind ca. 125 Photorezeptoren auf 1 Ganglienzelle verschaltet, im Bereich der Fovea hingegen ist diese Verschaltung nahezu 1:1 (Hubel, 1989). Daraus resultiert, dass der foveale Bereich des Gesichtsfeldes neuronal überrepräsentiert ist, was ein sehr scharfes zentrales Sehen ermöglicht. Um aufgrund dieser Spezialisierung des zentralen Sehens mehrere Objekte foveal scharf sehen zu können, müssen schnelle, sakkadische Augenbewegungen durchgeführt werden, bei denen die Objekte kurz fixiert werden (Bear et al., 2008).

In der Retina der Katze können morphologisch drei unterschiedliche Ganglienzelltypen unterschieden werden, die X (α), Y (β) und W (γ) Zellen, die bezogen auf den Verlauf ihrer Axone wiederum dem Y-, X- und W-Pfad zugeordnet werden. 77% aller Ganglienzellen projizieren in den CGL (Illing and Wässle, 1981).

Am häufigsten vertreten sind mit 50% die X-Zellen, sie codieren für die von der Retina übermittelten Informationen über Form, Farbe und Mustern aus der visuellen Umgebung. Die Zellen sind nur in geringem Maße bewegungssensitiv, sie antworten tonisch auf statische Stimuli. Die X-Zellen besitzen kleine rezeptive Felder und ihre Nervenleitgeschwindigkeit ist gering (Garey et al., 1991). Die Y- Zellen hingegen haben große rezeptive Felder, eine hohe Nervenleitgeschwindigkeit und sie reagieren vornehmlich auf Bewegungen. Der dritte Zelltyp, die W-Zellen, reagiert auf Kontrast – und Helligkeitsveränderungen (Cleland et al., 1975).

Die Axone der X-,Y- und W-Zellen verlassen als Sehnerv das linke und rechte Auge im Bereich der Sehnervpapillen und vereinen sich in einer Struktur, die als *Chiasma opticum* bezeichnet wird. Die Axone des nasalen Hemifeldes der Netzhaut kreuzen im *Chiasma opticum* in die kontralaterale Hemisphäre des Gehirns, die Axone aus dem temporalen Hemifeld der Netzhaut verlaufen ipsilateral zum visuellen Cortex. Da die temporale Hemiretina des einen Auges die selbe Gesichtsfeldhälfte wie die nasale Hemiretina des anderen Auges sieht, wird durch die partielle Kreuzung der Axone gewährleistet, dass alle visuellen Eindrücke des jeweiligen Gesichtsfeldes in der kontralateral dazu gelegenen Hemisphäre prozessiert werden. Die Axone der Sehnerven werden nach dem Austritt aus dem *Chiasma opticum* als *Tractus opticus* bezeichnet und ziehen zum CGL im Thalamus, zu den CS und zur *Area pretectalis*

4.2.1 Vom CGL zum Cortex

Die zum CGL projizierenden retinofugalen Axonverbände der Katze und der Primaten haben unterschiedliche Terminationsmuster, daher wird nachfolgend auf beide Tiergruppen eingegangen.

Primaten

Die Trennung der parallelen Verarbeitungspfade für Bewegung (M-Typ) und für Form, Farbe und Konturen (P-Typ) bleiben auch im CGL erhalten. Das CGL des Primaten ist histologisch in sechs Hauptschichten einteilbar. Die retinalen Ganglienzellen des M-Typ projizieren in die magnozellulären Schichten I und II, die retinalen Ganglienzellen des P-Typ projizieren in die parvozellulären Schichten III bis VI. Ventral zu jeder parvo- und magnozellulären Schicht liegt eine sehr dünne Schicht mit koniozellulären Neuronen. Das koniozelluläre System versorgt hauptsächlich optomotorische Zentren.

Die Schichten I, IV und VI erhalten Afferenzen des kontralateralen Auges, die Schichten II, III und V die des ipsilateralen Auges.

Magno- und parvozelluläre Neurone projizieren hauptsächlich zu Schicht IV des primären visuellen Kortex (V1). Koniozelluläre Neurone projizieren in die Schichten I und III von V1 und zusätzlich in extrastriate Areale (Callaway, 2005).

Katze

Der parvozelluläre P-Pfad des Primaten ist funktionell homolog zum X-Pfad der Katze, der magnozelluläre M-Pfad entspricht dem Y-Pfad der Katze.

Das *Corpus geniculatum laterale* der Katze besteht aus den 5 Schichten A, A1, C, C1 und C2. Die Nervenfasern des ipsilateralen Auges projizieren in Schicht A1 und C1, die Fasern des kontralateralen Auges hingegen projizieren in die Schichten A, C und C2 (*Abbildung 2*). Die funktionelle Trennung der Verarbeitungspfade wird auch im CGL beibehalten, die bewegungssensitiven Y-Zellen projizieren in die parvozellulären Schichten des CGL und von dort ausgehend hauptsächlich zu Area 18. Die für Farbe und Form kodierenden X-Zellen projizieren in die magnozellulären Schichten des CGL und von dort zu Area 17. Die W-Zellen projizieren zu den parvozellulären Schichten von C1 und C2 und von dort zu Area 19 (Hickey and Guillery, 1974). Die Nachbarschaftsbeziehungen werden im CGL, Area 17 und Area 18 beibehalten, benachbarte Punkte in der Retina liegen in benachbarten Bereichen von CGL,

Area 17 und Area 18 – die Netzhaut wird somit dort jeweils topographisch abgebildet (Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979).

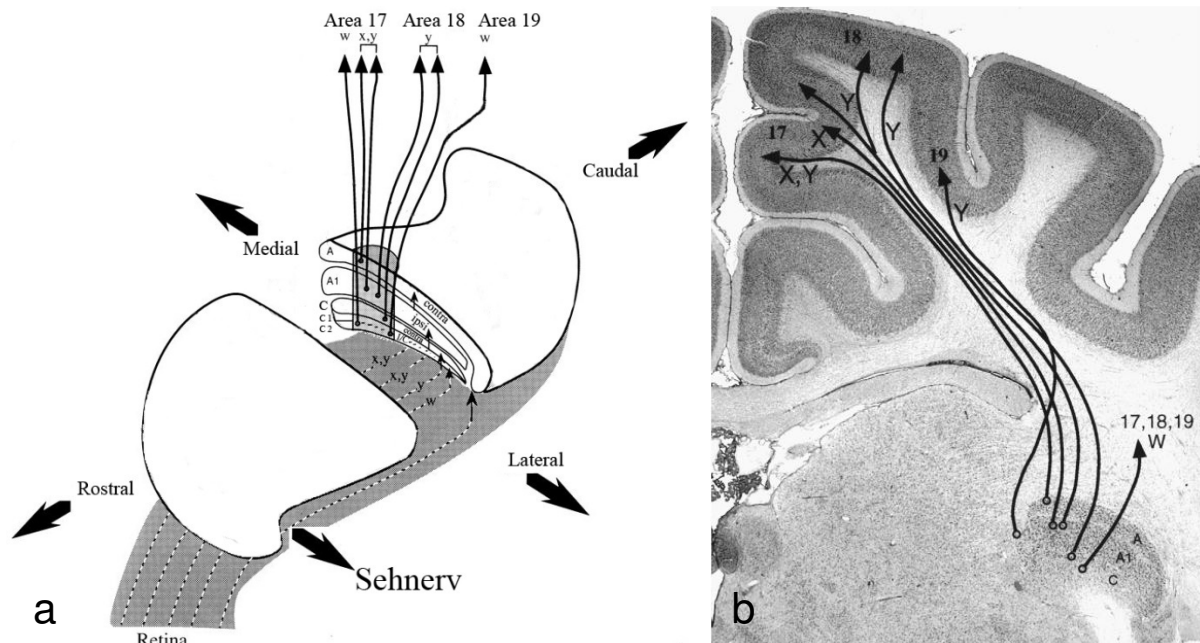


Abbildung 2: Projektionen des Corpus geniculatum laterale

a) Dargestellt ist in anterolateraler Ansicht das linke Corpus geniculatum laterale. Die retinofugalen Projektionen der Retina treten ventral in den CGL ein. Die funktionelle Trennung des X, Y und W-Pfads bleibt auch im CGL erhalten. Die für Farbe und Form kodierenden Zellen X-Zellen projizieren ausgehend vom CGL in Area 17, die bewegungssensitiven Y-Zellen projizieren ausgehend vom CGL hauptsächlich in Area 18. Die einzelnen Schichten des CGL werden exklusiv entweder von den Nervenfasern des kontra- oder ipsilateralen Auges innerviert. b) Der Gewebeschnitt zeigt zusammenfassend das Innervationsmuster von Area 17, 18 und 19 ausgehend vom CGL der Katze (modifiziert nach (Payne and Peters, 2001)).

4.2.2 Der visuelle Kortex

Der primäre visuelle Kortex (V1) erstreckt sich räumlich über den posterioren Pol des Okzipitallappens und ist das erste kortikale Areal zur Prozessierung visueller Informationen. Nahezu alle Afferenzen des CGL projizieren zu Schicht IV von V1. Bei den Primaten unterteilt sie sich in die Schichten IV-A, IV-B, IV-C_α und IV-C_β. Schicht IV-C_α wird vom bewegungssensitiven magnozellulären Pfad innerviert, in Schicht IV-C_β enden die Afferenzen des parvozellulären Pfads. Schicht VI wiederum projiziert zurück ins CGL, Schicht V auf die CS.

Über *feedforward* Verbindungen projiziert Schicht IV-C_α über V2 und V3 zum mediotemporalen Kortex (MT/V5), einem höheren Areal, das sensitiv ist für Bewegungen. Dieser Pfad wird als *dorsal stream* bezeichnet und erstreckt sich über weitere Areale im

dorsalen Okzipital- und Parietallappen. Die Zellen aus Schicht IV-C_β projizieren über V2 und V3 nach V4, einem höheren Areal zur Objekt- und Gesichtserkennung. Dieser Pfad wird als *ventral stream* bezeichnet und erstreckt sich ventral über weitere Areale im Okzipital- und Temporallappen. Die visuelle Verarbeitung erfolgt somit über zwei parallele Pfade, allerdings können V4 und MT über direkte Verbindungen miteinander interagieren.

Der primäre visuelle Kortex der Katze umfasst die Areale 17 und 18 (Tretter et al., 1975) und besteht homolog zum Affen aus 6 Schichten. Die Efferenzen des CGL enden hauptsächlich in Schicht IV, die den Fluss von Informationen über Schicht II und III und von dort über Schicht V an höhere Areale über *feedforward* Verbindungen weitergibt. Die Katze nutzt zur Verarbeitung visueller Informationen ebenfalls zwei parallele Pfade (*Abbildung 3*), allerdings weicht die Terminologie von der beim Primaten ab, V3 und V4 sind homolog zum Areal 21a der Katze, MT/V5 entspricht dem PMLS Kortex (Payne, 1993).

Neben den *feedforward* Verbindungen aus dem visuellen Kortex existieren auch *feedback* Verbindungen, über welche hierarchisch höhere Areale auf Areale niedriger Ordnung projizieren (Felleman and Van Essen, 1991). Aus anatomischer Sicht könnte die Verarbeitung visueller Stimuli im visuellen Kortex über die thalamischen Afferenzen ausschließlich *feedforward* prozessiert werden, was zur Folge hätte, dass das Antwortverhalten der Neurone auf einen Stimulus in niederen Arealen, z.B. V1, unabhängig von Modulationen aus höheren Arealen ist. Experimentell konnte diese These allerdings widerlegt werden, da durch Aktivierung oder Deaktivierung höherer Areale die Antworteigenschaften des primären visuellen Kortex modifizierbar sind. Durch thermische oder pharmakologische Deaktivierung des Areals PMLS bei der Katze bricht beispielsweise die Richtungsselektivität der Neurone in Area 17 und 18 zusammen (Galuske et al., 2002, Shen et al., 2006) und die pharmakologische Beeinflussung von Area 21a moduliert die Orientierungsselektivität in beiden Arealen (Huang et al., 2004). Beide Studien belegen, dass *feedback* Verbindungen essentiell an der einwandfreien Verarbeitung visueller Informationen beteiligt sind, sei es über den dorsalen oder den ventralen Pfad.

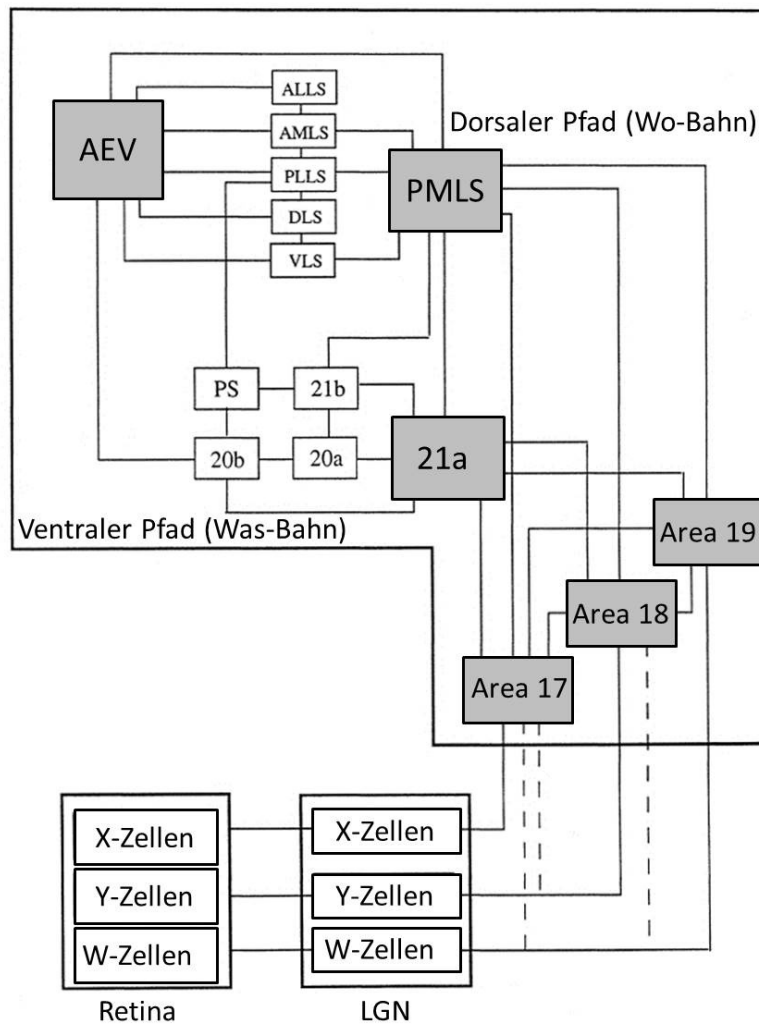


Abbildung 3: Das visuelle System der Katze

Ausgehend von der Retina gibt es 3 parallele visuelle Pfade (X, Y, W) deren Trennung ausgehend von der Retina auch im CGL erhalten bleibt. In Area 17, Area 18 und Area 19 werden die visuellen Informationen parallel verarbeitet. Die Verarbeitung in den höheren Arealen erfolgt anschließend über den ventralen (WAS) oder den dorsalen (WO) Pfad. In der Katze ist die Eingangsstufe für den ventralen Pfad Area 21 a und die Eingangsstufe für den dorsalen Pfad ist der PMLS Kortex (modifiziert nach Burke et al., 1998).

4.2.3 Kolumnäre Organisation des primären visuellen Kortex

Donald Olding Hebb stellte bereits 1949 die Hypothese auf, dass Neurone in Gruppen agieren, die lokal oder weit entfernt voneinander, kohärent kommunizieren, um Informationen zu verarbeiten (Hebb, 1949). Die Hypothese von Hebb konnte wenige Jahre später verifiziert werden. Dazu wurde der Begriff „Kolumne“ von Mountcastle eingeführt (Mountcastle, 1957), der am somatosensorischen Kortex festgestellt hatte, dass Neurone innerhalb einer vertikal verlaufenden Zellsäule oder Kolumne ähnliche rezeptive Felder aufweisen. Der Neokortex der Säugetiere ist in Kolumnen organisiert, die in ihrer lateralen Ausdehnung mehrere 100 μm umfassen können. Auch der visuelle Kortex ist kolumnär organisiert. Die Neurone im primären visuellen Kortex haben entlang einer vertikalen Achse in allen sechs Kortexschichten die gleichen Präferenzen für visuelle Stimuli. Hubel und Wiesel leiteten mit einer vertikal eingebrachten Elektrode die Neurone aus verschiedenen Schichten innerhalb einer Kolumne ab (Hubel and Wiesel, 1962, 1963) und konnten dabei zeigen, dass alle abgeleiteten Neurone entlang dieser Achse die gleiche Orientierungspräferenz aufwiesen. Das Modell der Orientierungskolumnen konnte durch neu entwickelte Methoden in den nachfolgenden Jahren bestätigt und erweitert werden. Mit Hilfe der Desoxyglucosemethode (Hubel et al., 1978) und des *Optical Imaging of Intrinsic Signals* (Bonhoeffer and Grinvald, 1993) konnte die Aktivität von Orientierungskolumnen mit hoher räumlicher Auflösung dargestellt werden. Eine einzelne Orientierungskolumne wiederum ist in zwei Kolumnen mit gegenläufiger Richtungspräferenz unterteilt (Shmuel and Grinvald, 1996, Swindale et al., 2003). Weiterführend konnte gezeigt werden, dass die Orientierungspräferenz benachbarter Kolumnen sich graduell verändert, wobei ihre rezeptiven Felder in nahezu identischen Bereichen des Gesichtsfelds liegen. Diese Beobachtung zusammenfassend beschreibt das Konzept der Hyperkolumne ((Hubel et al., 1978), *Abbildung 4*).

Die Neurone in Kolumnen gleicher Stimuluspräferenz sind sowohl horizontal als auch vertikal miteinander verbunden (Gilbert and Wiesel, 1979, 1983, Martin and Whitteridge, 1984, Gilbert and Wiesel, 1989, Hirsch and Gilbert, 1991, Angelucci et al., 2002). Gilbert und Wiesel konnten im Kortex der Katze horizontale axonale Projektionen von bis zu 8 mm Länge nachweisen (Gilbert et al., 1996).

Neben den Orientierungskolumnen existieren auch Augendominanzkolumnen, die sensitiv für die Stimulation von nur einem Auge sind (Hubel and Wiesel, 1962, Kennedy et al., 1976). Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass die Zellen in Schicht 4 in etwa alle 500 μm von dem jeweils anderen Auge dominiert werden (Payne and Berman, 1983).

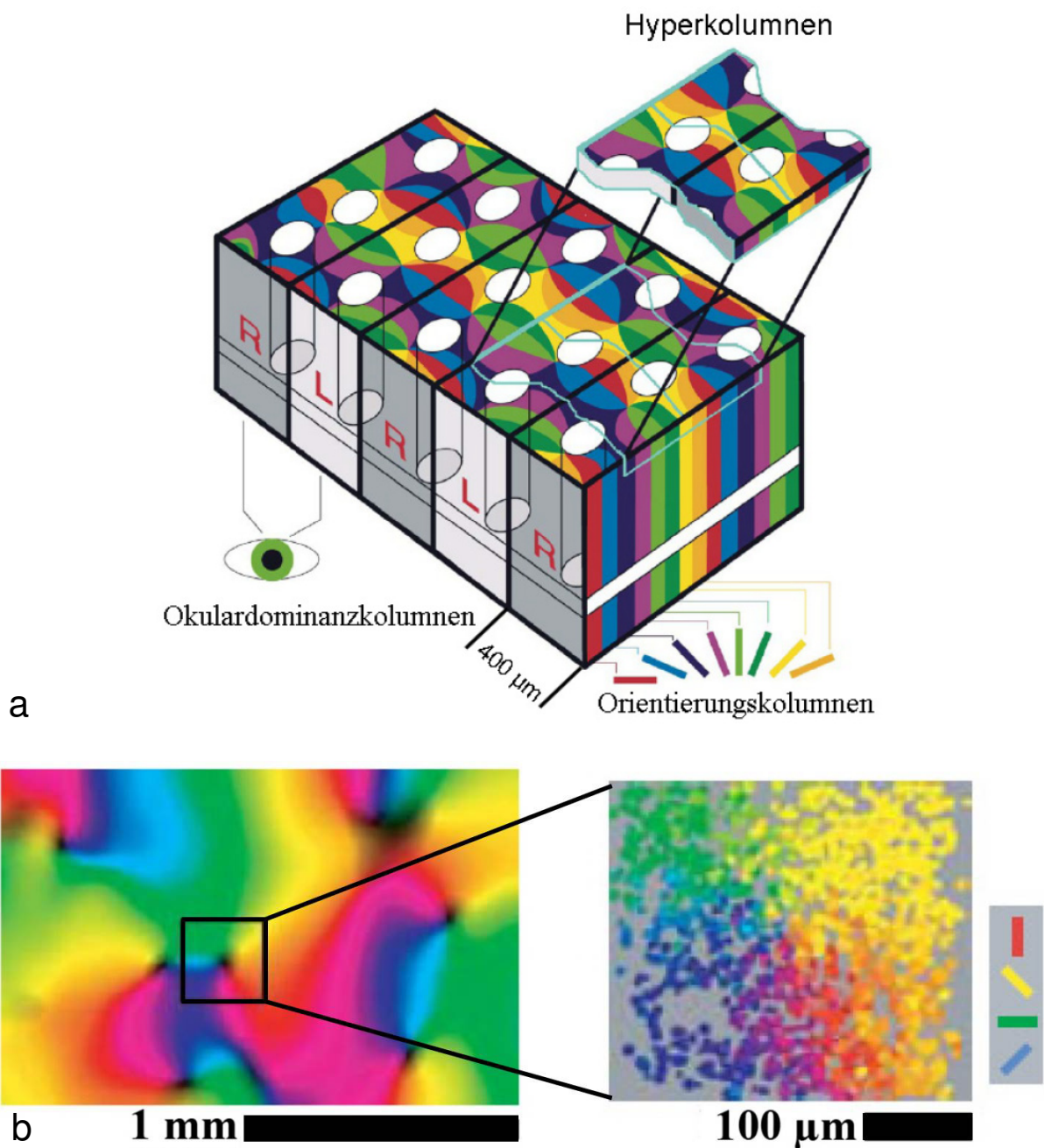


Abbildung 4: Der funktionelle Aufbau des visuellen Kortex

a) Dargestellt ist der funktionelle Aufbau des primären visuellen Kortex (Grinvald, 1999). Die Fehlfarben repräsentieren die einzelnen Orientierungskolumnen entsprechend der präferierten räumlichen Orientierung der Neurone. Die Okulardominanzkolumnen verarbeiten exklusiv die visuellen Informationen des kontralateralen (R) oder ipsilateralen (L) Auges. Die weißen Bereiche markieren die für das Farbsehen verantwortlichen Cytochromoxidase-Blobs. Hervorgehoben sind zwei Hyperkolumnen, welche alle Stimuluseigenschaften bezüglich Farbe und Orientierungen verarbeiten können. b) Die linke Abbildung zeigt die mit Hilfe des Intrinsic Imaging visualisierte Orientierungspräferenz der Neurone im primären visuellen Kortex. Der hervorgehobene Bereich zeigt räumlich hoch aufgelöst die Orientierungspräferenz der einzelnen Neurone. Die Aufnahme in zellulärer Auflösung basiert auf der Methodik des 2-Photon-Calcium-Imagings (Ohki et al., 2006).

4.2.4 Modulationen neuronaler Aktivität im visuellen Kortex

Wie bereits erwähnt, variiert die Antwortstärke der Neurone im visuellen Kortex auf einen Stimulus trotz konstanter Versuchsbedingungen. Das Antwortverhalten im primären visuellen Kortex kann *bottom-up* durch die visuellen Kerne des Thalamus oder *top-down* über *feedback* Verbindungen aus höheren Arealen moduliert werden (Hupe et al., 1998). Aufgrund dessen wird nachfolgend näher auf die visuellen Kerne des Thalamus und auf den posteromedialen lateralen suprasylvischen Kortex (PMLS) der Katze eingegangen. Der PMLS-Kortex der Katze ist ein visuelles Areal höherer Ordnung, dass über *feedback* Verbindungen die Aktivität in Area 18 modulieren kann (Galuske et al., 2002).

4.2.5 Der visuelle Thalamus

Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Erforschung der Variabilitäten innerhalb evozierter Aktivitäten im primären visuellen Kortex. Der Thalamus ist eine mögliche Quelle, auf welche die Variabilitäten zurückzuführen sind. Aus anatomischer Sicht ist die Lage des Thalamus ideal, um die Weiterleitung von Informationen zum Kortex zu kontrollieren (Singer, 1977). Aufgrund seiner Konnektivität zu höheren Arealen kann er diese auch modulieren.

Der visuelle Thalamus besteht aus drei Hauptkernen, dem *Pulvinar*, dem *Nucleus reticularis thalami* (TRN) und dem *Corpus geniculatum laterale* (CGL). Das CGL wird klassisch als die wesentliche Relaystation im retinokortikalen Pfad angesehen. Das *Pulvinar* ist weit weniger erforscht als das CGL und seine funktionelle Rolle ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Funktionell wird es mit der visuellen Aufmerksamkeit in Zusammenhang gebracht, da die pulvinaren Neurone durch Fokussierung der Aufmerksamkeit moduliert werden (Bender, 1982, Petersen et al., 1985, Robinson et al., 1986, Bender and Youakim, 2001) und Läsionen zu Defiziten der räumlichen Aufmerksamkeit führen (Chalupa et al., 1976, Ungerleider and Christensen, 1977). Anatomische Studien (Adams et al., 2000, Shipp, 2003) offenbarten intensive reziproke Verbindungen zu höheren Arealen (*Abbildung 5*). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass durch die reversible Deaktivierung des *Pulvinar* die supragranulären Neurone in V1 nicht mehr in der Lage waren, auf einen Stimulus zu antworten, während sich durch die elektrische Stimulation von *Pulvinar* die Antwortstärke auf den Stimulus erhöhte. Nach dieser Hypothese kann das *Pulvinar* den Fluss von Informationen zum primären visuellen Kortex und höheren Arealen kontrollieren und blockieren (Purushothaman et al., 2012).

Neben dem Pulvinar besitzt auch der TRN das Potential, den thalamokortikalen Fluss von Informationen zu kontrollieren (McAlonan et al., 2006, 2008). Der TRN wird vom präfrontalen Kortex, dem primären visuellen Kortex, den *Colliculi superiores* und der *Formatio reticularis* innerviert (Kolmac and Mitrofanis, 1998, Montero, 2000, Zikopoulos and Barbas, 2006). Aufgrund dessen ist der TRN dazu in der Lage, bereits prozessierte Informationen aus höheren Arealen zu integrieren und auf die Situation abgestimmt, die thalamokortikale Transmission zu modulieren. Die Projektionen des TRN auf den CGL und Pulvinar sind ausnahmslos inhibitorisch (Saalmann and Kastner, 2011). Durch Defokussierung der Aufmerksamkeit erhöht sich die Feuerrate der TRN Neurone, wohingegen die Feuerrate im CGL sinkt (McAlonan et al., 2006). Alternativ kann über aufsteigende inhibitorische Projektionen der *Formatio reticularis* der TRN gehemmt werden, was wiederum die Aktivität im CGL steigert. Des Weiteren sind die TRN-Neurone an der Initiierung des thalamokortikalen Alphasrhythmus beteiligt. Als Alphaoszillationen werden Oszillationen im Frequenzbereich zwischen 7 und 14 Hz bezeichnet. Den TRN-Neuronen wird eine Schrittmacherfunktion zugeschrieben, da sie „de novo“ im Frequenzbereich zwischen 7-15 Hz oszillieren können (Steriade et al., 1987, Steriade et al., 1993). Zusammenfassend gilt der TRN als Teil eines möglichen Kontrollnetzwerks (Lopes da Silva, 1991, Stam et al., 1999), dass den thalamokortikalen Fluss von Informationen kontrollieren kann.

Das CGL ist der zentrale Kern, über welchen die retino-thalamo-kortikale Übertragung visueller Informationen umgesetzt wird. Im Gegensatz zu den retinalen Afferenzen werden die Neurone des CGL auch von höheren Arealen innerviert. Interessanterweise stammen nur ca. 12% der Eingänge im CGL aus der Retina, 28% der Synapsen bilden lokale inhibitorische Interneurone und die übrigen 60% der Synapsen stammen von Feedbackverbindungen visueller Areale und aus Bereichen der *Formatio reticularis* (Gilbert and Kelly, 1975, Van Horn et al., 2000). Das klassische Bild des Thalamus als Relaystation erscheint heutzutage überholt. Schon vor 30 Jahren wurde nachgewiesen, dass thalamische Neurone entweder tonisch oder phasisch feuern können (Mukhametov et al., 1970, Deschenes et al., 1982, Llinas and Jahnsen, 1982). Aufgrund dieser zwei Modi besitzen thalamische Neurone daher prinzipiell das Potential, retinale Informationen differenziert an den visuellen Kortex weiterzugeben. Experimente an Makaken haben gezeigt, dass über *feedback* Verbindungen aus dem kortikalen Areal MT das Antwortverhalten im CGL auf bewegte Stimuli moduliert wird (Sillito and Jones, 2002, Sillito et al., 2006). Darüber hinaus kann das Antwortverhalten im CGL *top-down* durch Fokussierung der Aufmerksamkeit moduliert werden (O'Connor et al., 2002). Diese fMRI-Studie demonstriert, dass durch Fokussierung der Aufmerksamkeit im CGL die Aktivitäten innerhalb der Baseline vor Stimulationsbeginn und die Antwort auf den fokussierten Stimulus erhöht sind. Auch

kortikofugale Projektion aus dem primären visuellen Kortex von Makaken und Katze beeinflussen exzitatorisch das Antwortverhalten von CGL Neuronen und könnten somit den retinalen Informationsfluss zum visuellen Kortex regulieren (Singer, 1977).

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass alle drei Kerne des visuellen Thalamus (CGL, Pulvinar, TRN) durch *top-down* Einflüsse schon subkortikal den thalamokortikalen Fluss von Informationen modulieren können. Die Hypothese, dass der Thalamus den Informationsfluss zum visuellen Kortex reguliert (Singer, 1977, Lopes da Silva, 1991, Stam et al., 1999) wird in der Fachliteratur und nachfolgend in dieser Arbeit als *thalamisches gating* bezeichnet.

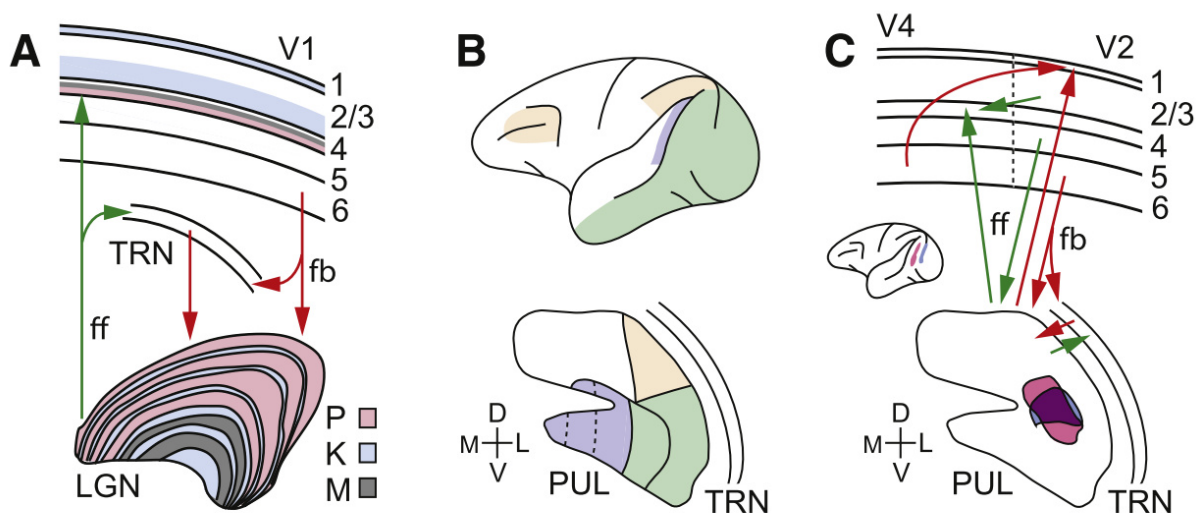


Abbildung 5: Die thalamokortikale Konnektivität

A) Die Abbildung visualisiert die feedforward Projektionen der parvo-, konio- und magnozellulären Neurone des CGL nach V1. Die feedback Verbindungen aus V1 projizieren entweder direkt oder über den Nucleus reticularis (TRN) zurück zum CGL (Saalmann and Kastner, 2011).

B) Die farbkodierten kortikalen Regionen (fronto-parietal, medio-temporal, inferotemporal, okzipital) sind reziprok verknüpft mit den Neuronen innerhalb der entsprechend farbkodierten Kompartimenten des Pulvinar (Gutierrez et al., 1995, Stepniewska and Kaas, 1997, Saalmann and Kastner, 2011).

C) Dargestellt ist die wechselseitige Interaktion von V4, V2 und dem Pulvinar über ein Netzwerk aus feedforward- und feedback Verbindungen. Tracerinjektionen in V2 (blau) und V4 (pink) haben überlappende Projektionsgebiete im Pulvinar (lila) offenbart (Adams et al., 2000, Saalmann and Kastner, 2011).

4.3 Der posteromediale laterale suprasylvische Kortex (PMLS)

Der PMLS Kortex der Katze ist ein Areal hierarchisch hoher Ordnung des dorsalen Pfades und kann über *feedback* Verbindungen die Aktivität der Neurone im primären visuellen Kortex modulieren. PMLS ist die dominierende Struktur zur Erfassung von Bewegungen im extrastriaten Kortex der Katze (Lomber et al., 1996, Rudolph and Pasternak, 1996) und das Areal gilt als homolog zu MT/V5 des Primaten (Payne, 1993). Auf dieses Areal soll nun näher eingegangen werden, da es aufgrund seiner modulatorischen Beeinflussung der neuronalen Aktivität von Area 18 thematisch wichtig für meine Arbeit ist.

Die anatomischen Voraussetzungen zur Modulation der Aktivität von Area 18 sind über die ausgeprägten *feedback* Verbindungen von PMLS gegeben (Symonds and Rosenquist, 1984) und wurden von Payne und Lomber quantifiziert (Payne and Lomber, 2003). Mit Hilfe der WGA-HRP-Methodik konnte nachgewiesen werden, dass 26% aller synaptischen Eingänge in Area 18 aus dem MS Kortex stammen. Es existieren aber neben den direkten *feedback* Verbindungen auch indirekte Verbindungen über die Areale A17, A19 und über Kerne des Thalamus, die wiederum stark von direkten *feedback* Verbindungen, die aus PMLS stammen, innerviert werden (Payne and Lomber, 2003). Eine Übersicht zur Konnektivität der *feedback* Verbindungen zeigt *Abbildung 6*.

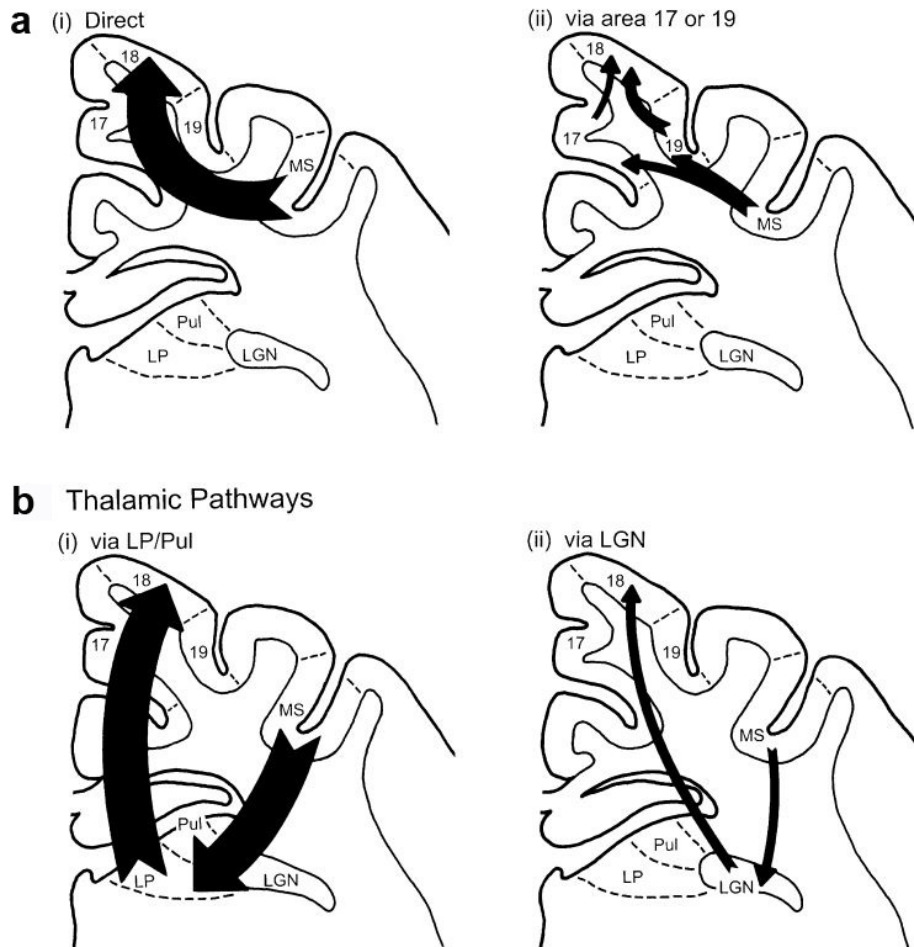


Abbildung 6: Feedbackverbindungen aus dem MS-Kortex der Katze

Darstellung der kortiko-kortikalen und thalamo-kortikalen feedback-Projektionen aus dem MS-Kortex der Katze nach Area 18. Neben den direkten Verbindungen zwischen MS und Area 18 existieren auch Indirekte über Area 17, Area 19 oder die Kerne des visuellen Thalamus. Die Breite der Pfeile repräsentiert die relative Anzahl der Rückprojektionen (Payne and Lomber, 2003).

Die *feedback* Verbindungen zum primären visuellen Kortex sind exzitatorischer Natur. Tracer Studien mit biotinylierten Dextranaminen und Lucifer Yellow ergaben, dass mehr als 2/3 aller markierten Zellen Pyramidenzellen sind und die übrigen Zellen wurden als bedornte multipolare Neurone klassifiziert (Elston and Rosa, 1997, Anderson et al., 1998).

Die funktionellen modulatorischen Eigenschaften von PMLS der Katze und MT des Primaten wurden in Deaktivierungsstudien in Tierversuchen studiert. Hupe und Bullier analysierten die Aktionspotentialfrequenzen in V1, V2 und V3 während reversibler Kühlung des MS-Sulkus beim Primaten (Bullier et al., 2001). Die Spikeraten in allen drei Arealen brachen unter Kühlung von MS massiv ein, während als Stimulus ein weißer Balken auf einem Hintergrund mit niedrigem Kontrast dargeboten wurde. Anschließend veränderten die Experimentatoren die Salienz des Stimulus durch Reduzierung des Kontrasts zwischen Balken und Hintergrund. Der größte Einbruch der Spikerate war bei Stimuli mit sehr niedriger Salienz zu

beobachten. In einer Studie zuvor demonstrierte die gleiche Gruppe, dass der Einfluss von *feedback* Verbindungen wichtig ist, um Objekte vom Hintergrund zu diskriminieren (Hupe et al., 1998).

Galuske und Kollegen deaktivierten PMLS in der Katze durch reversible Kühlung. Bedingt durch das Ausschalten der *feedback* Verbindungen ging die Richtungsselektivität der Neurone in Area 18 verloren, wobei die Orientierungsselektivität hingegen weitestgehend erhalten blieb (Galuske et al., 2002). Galuske und Kollegen konnten diese Ergebnisse sowohl mittels Optical Imaging als auch elektrophysiologisch nachweisen. Den gleichen Zusammenhang bestätigten Shen und Shou für Area 17 durch die pharmakologische Deaktivierung von PMLS (Shen et al., 2006). Die Richtungs- bzw. Orientierungsselektivität wurde in beiden Studien parallel von tausenden von Neuronen durch Optical Imaging aufgezeichnet und es konnte nachgewiesen werden, dass die Stärke der abgeleiteten optischen Karten durch PMLS moduliert wird.

4.4 Voltage Sensitive Dye Imaging

Die Perzeption aller sensorischen Einflüsse aus der uns umgebenden Welt, sowie die kognitiven Fähigkeiten des Gehirns unterliegen neuronalen Netzwerken, welche sich aus Populationen von Neuronen zusammensetzen. Mit Hilfe von spannungsabhängigen Farbstoffen und einer High-Speed-Kamera lässt sich die Aktivität dieser Populationen visualisieren. Die Methodik zur Visualisierung dieser Aktivitäten ist bekannt unter dem Begriff *Voltage Sensitive Dye Imaging* (VSDI). Die Grundlage dieser Technik basiert auf spannungsabhängigen Farbstoffen, welche sich an die Membran von Nervenzellen binden können und ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit zum Membranpotential verändern. Der Farbstoff agiert als molekularer Signalumwandler, der die Veränderungen innerhalb des Membranpotentials in optische Signale umsetzt. Die messbare neuronale Aktivität reflektiert vor allem unterschwellige Membranpotentiale inhibitorischer und exzitatorischer Neurone, wobei letztere mit ca. 75 % deutlich stärker im Neokortex vertreten sind (Hendry et al., 1987). Das VSD Signal ist somit hauptsächlich auf den synaptischen Input der Dendriten großer Pyramidenzellen in Schicht II und III zurückzuführen (*Abbildung 7*), da die Membranoberfläche von Dendriten pro Zelle um ein vielfaches größer ist, als die Oberfläche von unmyelinisierten Axonen und den Somata (Grinvald, 1999, Petersen et al., 2003). Da die zeitliche Auflösung des VSDI im Millisekunden Bereich liegt, können neuronale Prozesse im Gehirn nahezu in Echtzeit bei hoher räumlicher Auflösung ($< 50 \mu\text{m}$) studiert werden.

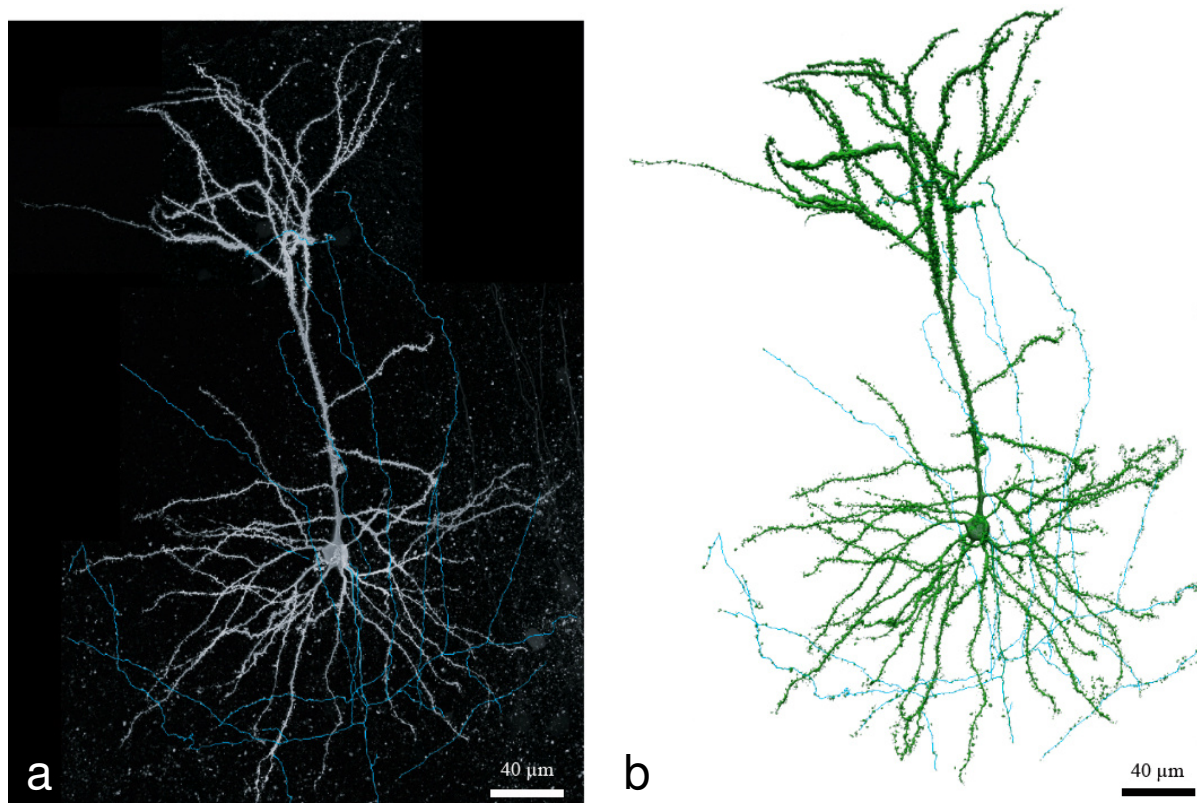


Abbildung 7: Pyramidenzelle

Dargestellt ist in a) eine Pyramidenzelle aus Schicht III des frontalen Kortex der Maus und in b) die Rekonstruktion der Zelle. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Membranoberfläche der Dendriten größer ist, als die des Zellkörpers. Da der spannungssensitive Farbstoff an die Membran der Nervenzellen bindet, reflektiert das VSD Signal somit hauptsächlich Membranpotentialveränderungen am Dendritenbaum von Nervenzellen (modifiziert nach (Luebke, Luebke et al., 2010)).

Die Pionierarbeiten auf dem Feld des VSDI und die Etablierung der Methodik wurden vor ca. 50 Jahren von Tasaki, Cohen und Salzberg geleistet (Cohen et al., 1968, Tasaki et al., 1968, Salzberg et al., 1973, Salzberg et al., 1977, Grinvald et al., 1984). Sie leiteten erstmals optisch die neuronale Aktivität am Riesenaxon von Tintenfischen (*Loligo vulgaris*) und einzelnen Nervenzellen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) mit Hilfe von spannungsabhängigen Farbstoffen ab. Durch Optimierungen der Methodik, durch die Entwicklung neuartiger Farbstoffe (Shoham et al., 1999) und technischer Quantensprünge in der Kameratechnik innerhalb des letzten Jahrzehnts kann heutzutage simultan die Aktivität tausender Neurone im Gehirn von Amphibien, Reptilien und Säugetieren auf diese Weise visualisiert werden. Die Entwicklung neuartiger Farbstoffe war entscheidend für das Imaging mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis. Die noch vor 15 Jahren etablierten Farbstoffe (RH 795) wiesen das Problem auf, dass ihre Exzitationswellenlänge mit dem Absorptionsspektrum des Hämoglobins zusammenfiel. Veränderungen innerhalb der Hämoglobinkonzentration wirkten sich somit direkt auf die Amplitude des gemessenen

Signals aus. Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff (RH 1692) hat ein Emissionsspektrum von >670 nm und ist somit weit vom Absorptionsspektrum des Hämoglobins entfernt, wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis um das zehnfache verbessert (Shoham et al., 1999).

Im direkten Vergleich mit anderen Methoden spielt das VSD Imaging eine wichtige Rolle in den Neurowissenschaften, da es einen optimalen Kompromiss zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung aufweist.

	Zeitliche Auflösung	Räumliche Auflösung
VSDI	1 ms	50 μm
fMRI	> 1000 ms	> 1000 μm
Intrinsic Imaging	> 1000 ms	50 μm
EEG	1 ms	>3000 μm
MEG	1 ms	2000 μm
PET	50 ms	4000 μm

Tabelle 1: Vergleich von Ableitmethoden

Dargestellt ist die zeitliche und räumliche Auflösung verschiedener Aufnahmetechniken zur Ableitung neuronaler Aktivitäten (VSDI = Voltage Sensitive Dye Imaging; fMRI = Functional Magnetic Resonance Imaging; EEG = Elektroenzephalographie; MEG = Magnetoencephalographie; PET = Positron Emission Tomographie).

4.5 Spontanaktivität

Durch Fortschritte in der Aufnahmetechnik hat man innerhalb der letzten 15-20 Jahre herausgefunden, dass die Neurone des Neokortex auch in Abwesenheit eines sensorischen Stimulus spontan aktiv sind. Zuvor war die gebräuchliche Annahme, dass spontane Entladungen von Neuronen ein stochastischer Prozess sind und dass diese Aktivitäten selbst zwischen benachbarten Neuronen unkorreliert sind (Softky and Koch, 1993, Shadlen and Newsome, 1994, van Vreeswijk and Sompolinsky, 1996, Amit and Brunel, 1997). Die *Trial-to-Trial* Variabilität trotz gleicher Stimulationsbedingungen wurde bis zu diesem Zeitpunkt dem Einfluss von Störsignalen zugeschrieben, welche durch das Aufmitteln

mehrerer Aufnahmesequenzen beseitigt werden könnten. Allerdings hat sich auf dem Gebiet der Spontanaktivität ein Paradigmenwechsel vollzogen und der spontanen Aktivität der Neurone des Neokortex wird eine „Funktion“ zugeschrieben. 1996 hat erstmals Arieli mit Hilfe des VSDI synchrone Spontanaktivität ganzer Populationen von Neuronen nachgewiesen und herausgefunden, dass die Spontanaktivität vor dem Stimulusonset, die Antwortstärke des Neuronenverbandes während der Stimulation moduliert (Arieli et al., 1996). In einer Nachfolgestudie wurde beschrieben, dass die Feuerrate einzelner spontan aktiver Neurone von der Spontanaktivität der gesamten lokalen Populationen abhängig ist (Tsodyks et al., 1999). Darüber hinaus konnten Muster innerhalb der Spontanaktivität nachgewiesen werden, die den Mustern von evozierten Karten ähneln, und dass zeitgleich dazu die spontanen Spiketrains der simultan abgeleiteten Neurone mit dem Spiketrains während der Stimulation korrelieren. Die Muster der Spontanaktivität wurden von Kenet und Arieli in den folgenden Jahren intensiv studiert und ihre Ergebnisse wurden 2003 publiziert (Kenet et al., 2003). Sie demonstrierten, dass es dynamische, sich verändernde Muster innerhalb der Spontanaktivität gibt, die hohe Korrelationen mit Stimulus-induzierten Orientierungskarten haben. Somit wurde nachgewiesen, dass spontan hochspezifische Muster auftreten, die die funktionelle Architektur des Netzwerks reflektieren.

In humanen MEG und EEG Studien hat man festgestellt, dass spontane oszillatorische Aktivitäten hoher Amplitude im Alphanband innerhalb des posterioren okzipitalen Kortex die visuelle Perzeption negativ beeinflussen. Während Phasen hoher Alphaaktivität konnten Probanden Stimuli mit niedriger Salienz nicht erkennen, schlossen in Diskriminierungsaufgaben signifikant schlechter ab und die visuell hervorgerufenen Potentiale durch einen Stimulus fielen geringer aus (Ergenoglu et al., 2004, Thut et al., 2006, Romei et al., 2008a, van Dijk et al., 2008, Mathewson et al., 2009).

Daraus hat sich die Hypothese entwickelt, dass die spontanen Schwankungen innerhalb des Alphanbandes direkt die Erregbarkeit der Neurone im primären visuellen Kortex beeinflussen. Durch Bestätigung dieser Hypothese könnte die hohe *Trial-to-Trial* Variabilität in Optical Imaging Daten und elektrophysiologischen Messungen besser erklärt werden. Die Modulation der Erregbarkeit in Abhängigkeit von der Alphaaktivität konnte bislang allerdings noch nicht direkt nachgewiesen werden. Mit Hilfe des *Voltage Sensitive Dye Imagings* kann nun direkt überprüft werden, ob in Abhängigkeit vom Alparhythmus der Erregungsgrad der Neurone im primären visuellen Kortex spontanen Schwankungen unterliegt, da die Amplitude des Farbstoffs vor allem unterschwellige dendritische Membranpotentiale reflektiert. Daraus entwickelt sich die Zielsetzung für die vorliegende Dissertation.

4.6 Motivation der Studie

Mit Hilfe spannungsabhängiger Farbstoffe habe ich optisch die Aktivitäten neuronaler Populationen im primären visuellen Kortex der Katze aufgenommen und simultan die Areale PMLS und Area 18 elektrophysiologisch abgeleitet. Trotz konstanter Versuchsbedingungen weisen die neuronale Daten eine hohe *Trial-to-Trial* Variabilität auf. Ad hoc gibt es drei verschiedene Erklärungsansätze, wie es zu den Variabilitäten kommen kann.

Die Variabilitäten sind zurückzuführen auf –

1. - den Einfluss von biologischen oder technischen Störsignalen.
2. - den Einfluss von spontaner neuronaler Aktivität.
3. - *top-down* Modulationen der Aktivität in Area 18.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Studium von Störsignalen, denn nur wenn diese ausgeschlossen werden können, kann überprüft werden, ob die Variabilitäten neuronalen Ursprungs sind.

Im zweiten Teil der Arbeit soll geklärt werden, ob die hohe *Trial-to-Trial* Variabilität meiner VSD-Daten auf den Einfluss der Spontanaktivität in Area 18 zurückzuführen ist. Wie bereits dargestellt, besteht die Hypothese, dass die oszillatorische Aktivität im Alphaband die neuronale Erregbarkeit beeinflusst (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013). Mit Hilfe des VSD-Imagings kann diese Hypothese überprüft werden. Aufgrund der hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung des VSDI ist es möglich, die neuronale Erregbarkeit in Area 18 zu visualisieren. Aus diesem Grund kann verifiziert werden, ob zwischen der Erregbarkeit und der vorherrschenden Alphaaktivität in Area 18 oder im hierarchisch höheren PMLS Kortex ein kausaler Zusammenhang besteht.

4.7 Arbeitshypothese

1. Die Trial-to-Trial Variabilität innerhalb der evozierten neuronalen Aktivität ist auf das Ausmaß der Spontanaktivität kurz vor Beginn der Stimulation zurückzuführen.
2. Die Spontanaktivität reflektiert den Erregungsgrad der kortikalen Neurone und ist vom aktuellen *brain state* abhängig.
3. Die Trial-to-Trial Variabilität ist schlussendlich auf oszillatorische Schwankungen innerhalb des Alfabandes, die wiederum den aktuellen *brain state* reflektieren, zurückzuführen.

5 Methoden

Zusammenfassung

Um das Versuchsvorhaben umzusetzen, wurde in Area 18 und PMLS simultan die neuronale Aktivität elektrophysiologisch abgeleitet. Parallel dazu wurde optisch mit spannungssensitiven Farbstoffen und einer High-Speed-Kamera die Aktivität in Area 18 räumlich und zeitlich hoch aufgelöst aufgezeichnet. Mit Hilfe implantierter kortikaler Elektroden wurden das Elektroenzephalogramm (EEG), die lokalen Feldpotentiale (LFP) und die Multi-Unit-Aktivität aufgenommen. Für die Studie wurden insgesamt 4 Katzen im Alter zwischen 24 – und 42 Monaten untersucht. Die Katzen stammten aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung in Frankfurt am Main. Die Untersuchungen und die dafür notwendigen operativen Eingriffe wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsverfahrens durchgeführt und stehen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz.

5.1 Operativer Eingriff

5.1.1 Anästhesie und Medikamentation

Die Anästhesie wurde durch die intramuskuläre Injektion von 10 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketamin 10 %, Bela-Pharm GmbH, Vechta) und 1 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, BayerVital, Leverkusen) initiiert. Um den Kreislauf zu stabilisieren wurde zusätzlich 0,1mg/kg des Parasympatholytikums Atropinsulfat (Fresenius Kabi, Bad Homburg) intramuskulär appliziert. Nach der anschließenden Intubation wurde die Katze mit Hilfe einer Atempumpe (Ugo Basile 6025 – Italien) beatmet. Der Atemdruck wurde zwischen 5-15 mbar gehalten, das Atemzugvolumen wurde auf ein Volumen von 50-60 ml eingestellt und die Atemfrequenz lag zwischen 10-20 Zyklen/Minute. Die Narkose wurde durch Beimischung des Inhalationsanästhetikums Halothan (1%) zur Atemluft (30% O₂; 70% N₂O) aufrechterhalten. Während des gesamten Experimentes wurden die Atemgase über ein Oxymeter/Capnometer überwacht (Smart Anesthesia Multi-Gas (SAM) Modul Dash 3000, USA). Die Temperatur des Versuchstiers wurde mit Hilfe einer Heizdecke konstant auf 38°C gehalten und durch ein rektal eingeführtes Thermometer kontrolliert. Das EKG wurde unter Verwendung eines Differentialverstärkers (AM502, Tektronix, USA) über zwei subkutane Elektroden auf einem Oszilloskop dargestellt. Um dem Flüssigkeitsverlust entgegenzuwirken, wurde über einen Venenkatheter mit einem Perfusor eine isotone Kochsalzlösung (0,9%, B.Braun Melsungen AG) mit einer Rate von 3 ml/h zugeführt. Der Glukosespiegel und die

Elektrolyte wurden durch die intravenöse Gabe von Glukose (10% Glukose-Lösung, B. Braun Melsungen AG) und Tufosin K 10 (Baxter, Deutschland) konstant gehalten. Während den Phasen des Imagings wurde die Halothanzufuhr auf 0,6% gesenkt und zur Vermeidung von Augenbewegungen wurde intravenös das Muskelrelaxans Pancuroniumbromid (0,3 mg/h) kontinuierlich infundiert.

5.1.2 Chirurgischer Eingriff

Der Kopf des Versuchstieres wurde in einem Stereotaxierahmen mit 2 Jochbeinstiften, 2 Ohrstiften und einem Kieferhalter fixiert. Zur Vorbereitung der Kraniotomie wurde zunächst der Schädel des Versuchstieres rasiert und mit Braunol desinfiziert. Mit einem Skalpell und 2 Spreizklemmen wurde median die Kopfhaut von der Stirn bis zum Hinterhauptsbein eröffnet. Um den Schädelknochen freizulegen, wurden mit einem Raspatorium das Muskelgewebe und die Knochenhaut entfernt. Unter Verwendung eines topographischen Atlanten des Katzenhirns (Reinonso-Suarez, 1961) und anhand der stereotaktischen Koordinaten nach Horsley und Clark wurden die Bereiche für die Kraniotomie zur Freilegung von Area 18 und PMLS auf dem Schädelknochen eingezeichnet (*Abbildung 8*). Die Methode nach Horsley und Clark basiert auf einem dreidimensionalen Koordinatensystem. Als Nullpunkt der 3 Raumachsen dient der Mittelpunkt zwischen den Spitzen beider Ohrstifte, also der Mittelpunkt der Interaurallinie. Für das VSD Imaging wird eine Ableitkammer benötigt, durch welche die Kamera die neuronale Aktivität erfassen kann (*Abbildung 13*). Die Ableitkammer, die einen Durchmesser von 20 mm besitzt, wurde in der Mittellinie bei der Koordinate A2, also 2 mm anterior zum Nullpunkt, zentriert. Danach wurden die Ausmaße der Kraniotomie mit einem Bleistift auf dem Schädelknochen markiert.

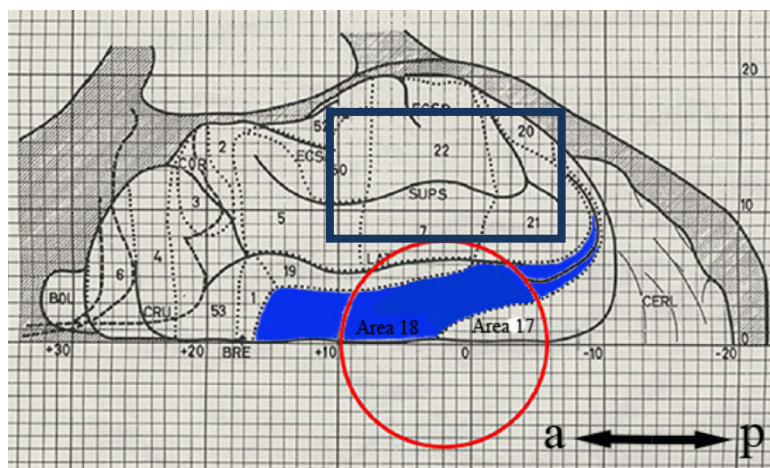


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kraniotomie

Dorsalansicht der rechten Hemisphäre und des knöchernen Schädels der Katze. Das blaue Rechteck repräsentiert den Bereich der PMLS-Kraniotomie, in welchen die Wolframelektroden implantiert wurden. In Rot dargestellt ist die Kraniotomie für die Ableitkammer zur Visualisierung der neuronalen Aktivitäten in Area 18 mittels VSDI.

Mit Hilfe eines Bohrers (Moto-Flex, Dremel, USA) wurde der Schädelknochen entlang der Markierungen Schicht für Schicht abgetragen. Nach erfolgreicher Kraniotomie wird der Basisring der Ableitkammer mit Dentalzement (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau) fixiert und mit Modellierwachs abgedichtet. Da der Dentalzement an metallischen Oberflächen besser haftet als an der glatten Schädeloberfläche, wurden zur Fixierung 6 Schrauben um den Bereich der Kraniotomie herum angebracht. Zur späteren Fixierung des Kopfes wurde anterior mit Zahnzement eine Kopfhalterung befestigt. Für die EEG Ableitung wurden Silberballelektroden posterior zwischen Dura mater und Schädelknochen eingebracht. Um den Kortex innerhalb der beiden Kraniotomien freizulegen, wurde die Dura mater entfernt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden Floating Fadenelektroden in Area 18 und Wolfram-Elektroden (Science Products, Hofheim) in PMLS vertikal zur Oberfläche eingeführt. Um die Austrocknung des Kortex zu verhindern, wurde die PMLS Kraniotomie mit Knochenwachs verschlossen. Die isolierten Elektrodendrähte wurden durch eine Aussparung des Basisrings geführt und an einen *Sub D Micro T* Stecker gelötet, über den die Elektroden mit dem Vorverstärker verbunden wurden. Die Hauptkammer wurde anschließend auf den Basisring geschraubt, mit inkompressiblem Silikonöl (DS Fluid, Boss Products) befüllt und einer Glasscheibe und einem Verschlussring abgeriegelt. Abschließend wurden die Kopfhalterung, die Ableitkammer und der *Sub d Micro T* Stecker über die gesamte Oberfläche des Schädelknochens hinweg mit Dentalzement fixiert.

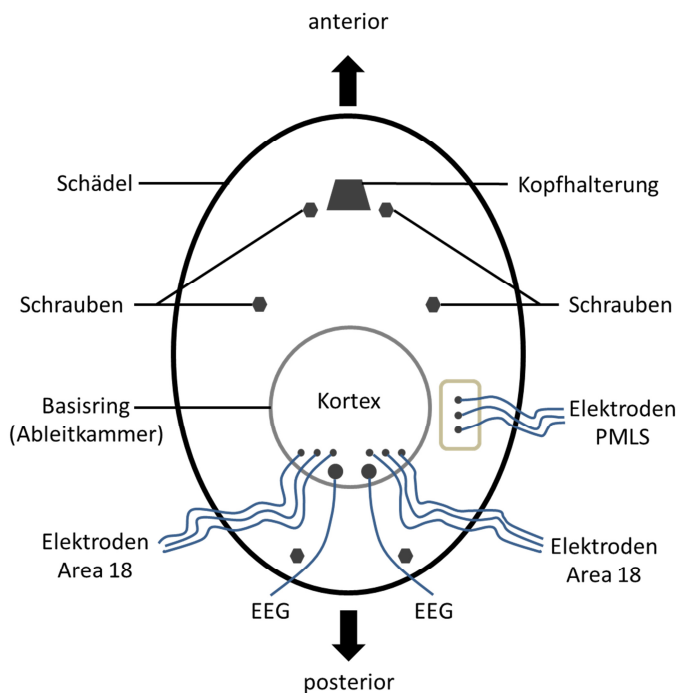


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Versuchskonfiguration nach dem chirurgischen Eingriff.

Die Abbildung stellt schematisch die Versuchskonfiguration nach dem chirurgischen Eingriff dar. Zur Fixierung des Kopfes wurde anterior mit Zahnzement eine Kopfhalterung befestigt. Da der Dentalzement an metallischen Oberflächen besser haftet als an der glatten Schädeloberfläche, wurden zur Fixierung 6 Schrauben um den Bereich der Kraniotomie herum angebracht. Durch die Implantation der Elektroden im posterioren Bereich der Ableitkammer war es im späteren Versuchsablauf möglich, die neuronale Aktivität in Area 18 simultan optisch und elektrophysiologisch abzuleiten. Lateral zur Ableitkammer ist die PMLS-Kraniotomie dargestellt. Durch die Implantation der Elektroden in den PMLS-Kortex war es möglich, neuronale Aktivität in Area 18 und PMLS zeitgleich abzuleiten.

5.2 VSD Imaging

5.2.1 Visuelle Stimulation

Zur visuellen Stimulation wurde ein 21 Zoll Monitor mit einer Bildwiederholungsrate von 100 Hz exakt 57 cm vor den Augen der Katze positioniert. Um aufgrund der Relaxierung durch Pancuroniumbromid eine scharfe Abbildung der Monitorinhalte auf die Netzhaut zu gewährleisten, wurden die Augen refraktiert und Kontaktlinsen mit einer entsprechenden Brechkraft eingesetzt. Dadurch entsprach 1 cm auf dem Monitor 1° Sehwinkel des

Gesichtsfeldes. Zur visuellen Stimulation wurden entweder schwarz-weiße Balkengitter oder Kinematogramme bewegter Punktmuster präsentiert.

Die Balkengitter hatten einen Kontrast von 97% und eine räumliche Frequenz von 0.15 Zyklen pro Grad Sehwinkel. Es gab 8 verschiedene Orientierungskonfigurationen (0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 315°) die sich jeweils mit einer Geschwindigkeit von 16° pro Sekunde orthogonal zur jeweiligen Orientierung des Balkengitters bewegten.

Die Kinematogramme bewegter Punktmuster wurden randomisiert in 8 Richtungen (0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 315°) mit einer Geschwindigkeit von 16° pro Sekunde präsentiert. Es wurden 384 Punkte mit einer Größe von je 5x5 Pixeln gezeigt. Die Helligkeit der Punkte betrug 57,24 Lumen, die des Hintergrundes 6,16 Lumen, was nach folgender Formel einem Kontrast von 80% entspricht (Michelson Kontrast).

$$\text{Contrast} = \frac{(\text{Luminance}_{\text{max}} - \text{Luminance}_{\text{min}})}{(\text{Luminance}_{\text{max}} + \text{Luminance}_{\text{min}})}$$

Zusätzlich zu beiden Stimulationsbedingungen wurden Aufnahmesequenzen gleicher Dauer aufgenommen, in welchen kein Stimulus dargeboten wurde. Aufnahmesequenzen ohne Stimulation werden als *Blank-Trial* bezeichnet. Allgemein wird eine einzelne Aufnahmesequenz als Trial bezeichnet,

5.2.2 Experimente

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit zwei unterschiedlichen Aufnahmesystemen durchgeführt. Die Experimente 140709 und 121409 werden nachfolgen als Phase 1 bezeichnet. Als Phase 2 hingegen werden die Experimente 112511 und 030512 bezeichnet-

Experimente der Phase 1

Die Versuchstiere wurden visuell mit Balkengittern stimuliert (randomisierte Reihenfolge). Ein Trial setzt sich zusammen aus einer 300 ms andauernden Baseline und einer 700 ms andauernden Stimulationsphase - ein Trial umfasst somit einen Zeitraum von 1 Sekunde. Während der Baseline ist der Bildschirm grau und während der Stimulation wird das bewegte Balkengitter dargeboten. Ergänzend wurden *Blank-Trials* mit einer Dauer von 1 Sekunde aufgenommen.

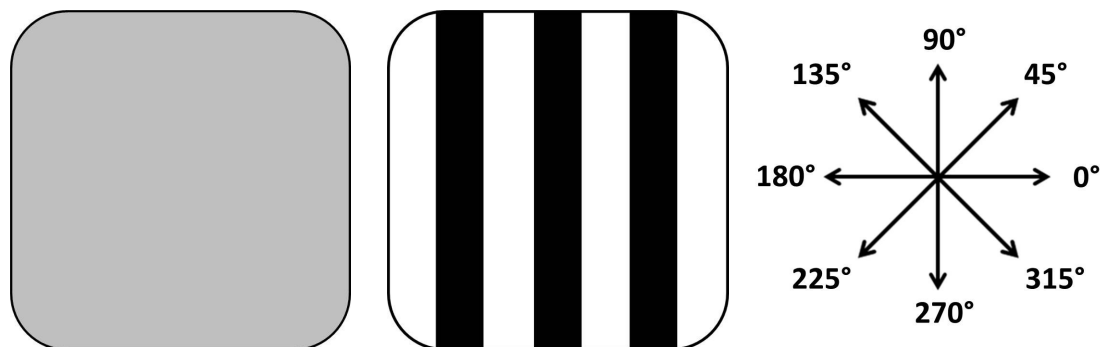


Abbildung 10: Visuelle Stimulation mit Balkengittern

Schematische Darstellung der dargebotenen Stimuli. Das abgerundete Rechteck in Grau repräsentiert den Blank-Stimulus. Während der Stimulation wurde ein Balkengitter gezeigt, welches sich in 8 Richtungen (0° , 45° , 90° , 135° , 180° , 225° , 270° , 315°) mit einer Geschwindigkeit von 16° pro Sekunde fortbewegte.

Experimente der Phase 2

Die Versuchstiere wurden mit Kinematogrammen bewegter Punktmuster (randomisierte Reihenfolge) stimuliert. Ein Trial setzt sich aus einer 1 Sekunde andauernden Baseline und einer 1 Sekunde andauernden Stimulationsphase zusammen, ein Trial umfasst somit einen Zeitraum von 2 Sekunden. Während der Baseline war der Bildschirm grau und während der Stimulation wurde das bewegte Punktmuster dargeboten. Ergänzend wurden *Blank-Trials* mit einer Dauer von 2 Sekunden aufgenommen.

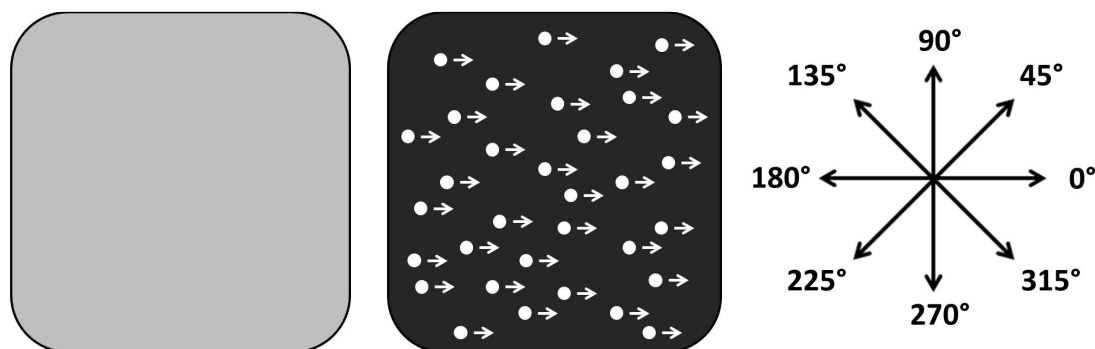


Abbildung 11: Visuelle Stimulation mit Kinematogrammen bewegter Punktmuster

Schematische Darstellung der dargebotenen Stimuli. Das abgerundete Rechteck in Grau repräsentiert den Blank-Stimulus. Während der Stimulation wurde Kinematogramme bewegter Punktmuster gezeigt, welche sich in 8 Richtungen (0° , 45° , 90° , 135° , 180° , 225° , 270° , 315°) mit einer Geschwindigkeit von 16° pro Sekunde fortbewegten.

5.2.3 Der Farbstoff

Für alle Experimente wurde der Farbstoff RH 1691 (Optical Imaging Ltd, Israel) verwendet. Der Farbstoff kann an die Oberfläche neuronaler Membranen binden und transformiert Veränderungen des Membranpotentials in optische Signale, indem sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs ändern (Grinvald, 1999, Shoham et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen spannungssensitiven Farbstoffen hat der Farbstoff RH 1691 den Vorteil, dass er im angeregten Zustand Licht mit einer Wellenlänge > 670 nm emittiert, wodurch Störsignale ausgehend vom Hämoglobin im 600 nm Bereich das Signal nicht kontaminieren (Shoham et al., 1999). Die Veränderungen innerhalb der Fluoreszenz korrelieren linear mit den Veränderungen des Membranpotentials der kortikalen Neurone in Schicht 2 und 3 (Grinvald, 1999, Petersen et al., 2003).

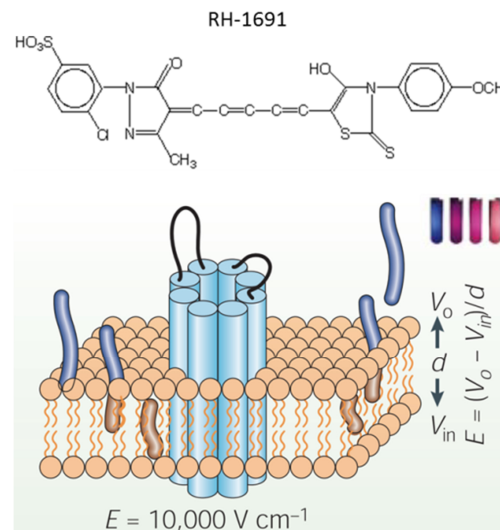


Abbildung 12: Der spannungssensitive Farbstoff RH-1691

Im oberen Bereich der Abbildung ist die funktionelle Einheit des spannungssensitiven Farbstoffmoleküls RH1691 dargestellt. Die Reagenzgläser darunter repräsentieren 4 Lösungen unterschiedlicher Polarität in welchen der Farbstoff gelöst wurde. Die Unterschiedlichen Farben dokumentieren die Sensitivität des Farbstoffs in Abhängigkeit von der Polarität des Milieus. Die untere Abbildung zeigt schematisch, wie sich der Farbstoff an die Lipiddoppelschicht der Membran bindet. Die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs werden erst nach der Bindung an die Membran aktiviert und die Intensität verändert sich in linearer Abhängigkeit zum Membranpotential (Grinvald, 1999).

Die Färbelösung:

Um die Färbelösung herzustellen, muss der gefriergetrocknete Farbstoff (1mg in 1.9 ml Puffer) in einem Puffer (pH 7,4) gelöst werden.

Zusammensetzung des Puffers :

[780 mg NaCl ; 37mg KCL ; 119mg HEPES ; 26 mg CaCl₂ ; 20 mg MgCl₂ ; 100 ml Aqua dest.]

5.2.4 Das Imaging

Die Ableitkammer wurde geöffnet, das Silikonöl abgezogen und über einen Zeitraum von 15 Minuten wurde die Rückstände des Öls mit einer isotonen Kochsalzlösung ausgewaschen. Anschließend wurde die Färbelösung auf den Kortex appliziert und über einen Zeitraum von 2,5 Stunden auf dem Kortex belassen. Um zu verhindern, dass der Farbstoff aggregiert, wurde die Lösung alle 15 Minuten mit einer Pipette durchmischt. Nach Ablauf der Färbezeit wurde die Färbelösung abgezogen und der Kortex 15 Minuten mit einer isotonen Kochsalzlösung gewaschen, um nicht gebundene Rückstände des Farbstoffs auszuwaschen. Nach dem Auswaschen wurde die Kochsalzlösung abgezogen, und die Kammer wurde mit Silikonöl befüllt und verschlossen. Durch das Verschließen der Kammer mit inkompressiblem Silikonöl wird das Pulsieren des Kortex im Rhythmus des Herzschlags vermindert, was sich positiv auf die Datenqualität auswirkt, da sich durch das Pulsieren des Kortex die Bildebene im Rhythmus des Herzens aus der Fokusebene der Kamera bewegt.

Das Imaging wurde unter Nutzung eines Imager 3001 (Optical Imaging Inc., Rehovot, Israel), einem Tandemlinsenmakroskop (Ratzlaff and Grinvald, 1991) und einer Hochgeschwindigkeitskamera (Photon Fokus MV1 D1312) durchgeführt (*Abbildung 13*). Die Kamera wurde auf eine Bildebene von 600 μm unterhalb der Kortexoberfläche fokussiert, um störende Blutgefäße auf der Kortexoberfläche aus dem Fokus zu halten und Signale in den oberen Kortexschichten zu messen. Der Chip der Kamera hatte eine Größe von 1312x1082 Pixeln, mit einer Pixelgröße von 8 μm . Bei einer einfachen Vergrößerung des Makroskops ist die Aufnahmeeinheit somit in der Lage, die neuronale Aktivität über eine Kortexfläche von $\sim 10,5 \text{ mm} \times 8,7 \text{ mm}$ aufzunehmen. Mit dem Ziel das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen, wurde die Pixelgröße durch ein 8-faches *offline Binning* vergrößert auf eine Fläche von 64x64 μm .

Um die durch den spannungssensitiven Farbstoff hervorgerufenen Veränderungen der Fluoreszenz zu detektieren, wurde der Kortex mit Licht einer Anregungswellenlänge von $630 \pm 10 \text{ nm}$ illuminiert. Technisch wurde dies durch eine seitlich zum Makroskop angebrachte Halogen-Kaltlichtquelle (100 W; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena) erreicht, von welcher aus das Licht zunächst durch einen Infrarotfilter gelenkt wurde, um den Kortex vor Hitzeschäden zu bewahren. Das Licht wurde anschließend bandpassgefiltert ($630 \pm 10 \text{ nm}$, Bandpass-Filter, Schott Glas, Mainz) und von einem dichromatischem Spiegel durch das Makroskop auf die Kortexoberfläche gelenkt. Das emittierte Licht passierte anschließend den dichromatischen Spiegel und wurde hochpassgefiltert (cutoff 665nm, Hochpass-Filter, Schott Glas, Mainz). Das resultierende Licht mit einer Wellenlänge von $>665 \text{ nm}$ fiel auf die Sensoren des Kamerachips und wurde in elektrische Potentiale umgewandelt (*Abbildung 13*).

Für eine hohe Bildqualität sollte die Belichtungszeit nicht zu kurz gewählt werden, für eine gute zeitliche Auflösung des Signals hingegen darf die Belichtungszeit nicht zu lang sein. Die Aufnahmen des Kortex wurden mit einer Bildrate von 150 Hz aufgezeichnet, was einer zeitlichen Auflösung von 6,7 ms pro Bild entspricht. Obwohl die Kamera prinzipiell dazu in der Lage ist, mit einer Rate $>1\text{kHz}$ zu operieren, wurde eine langsamere Framerate gewählt, da für Analysen auf Single Trial Niveau ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) notwendig ist. Eine zeitliche Auflösung von 6,7 ms pro Bild ist ein guter Kompromiss, um neuronale Aktivität nahezu in Echtzeit aufzunehmen.

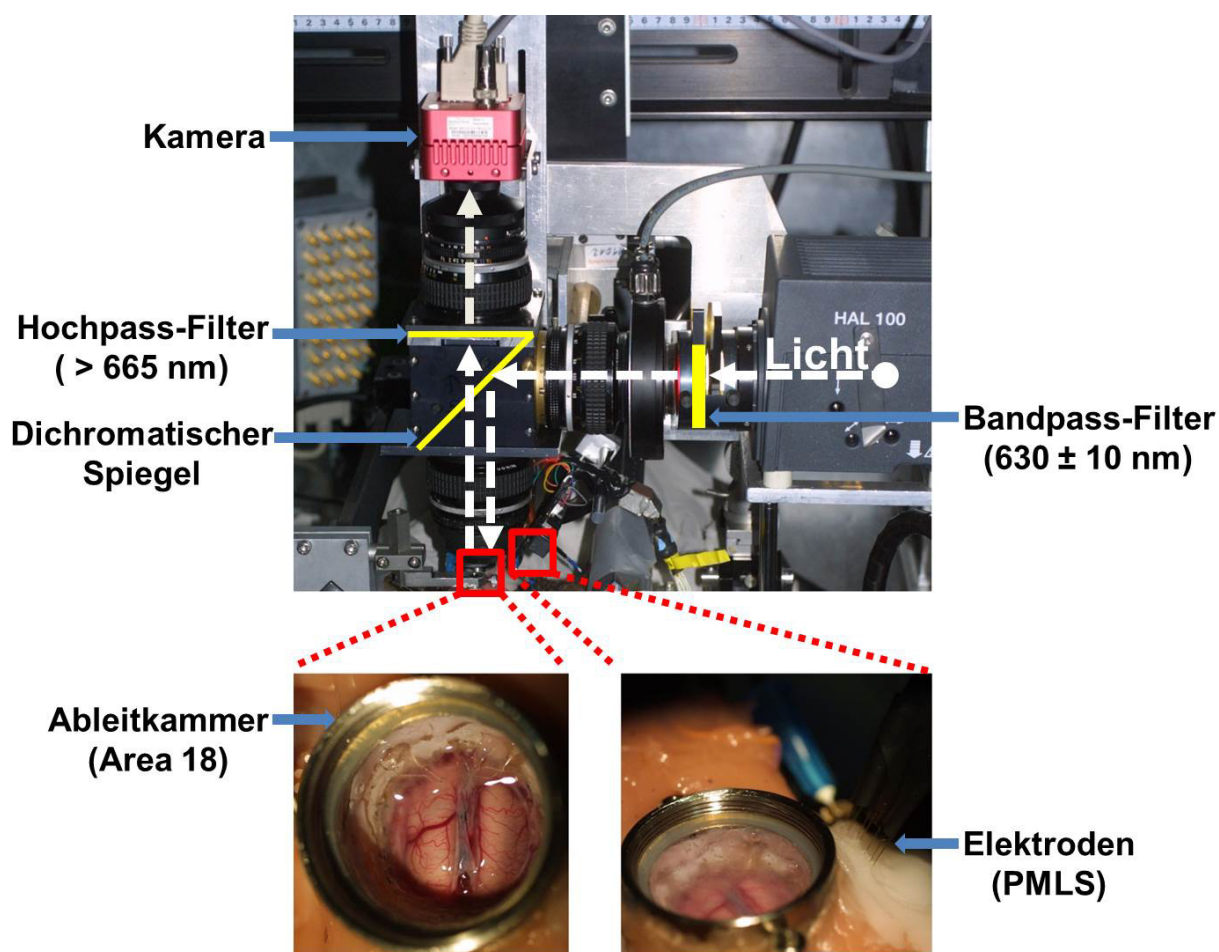


Abbildung 13: Das Aufnahmesystem

Die obere Abbildung zeigt das verwendete Aufnahmesystem. Unten links sind die Ableitkammer und Area 18 in direkter Aufsicht dargestellt, und unten rechts sind seitlich zur Ableitkammer die PMLS-Elektroden zu sehen. Ausgehend von der Lichtquelle (HAL 100) passiert das Licht zunächst einen Bandpassfilter ($630 \pm 10 \text{ nm}$) und wird anschließend vom dichromatischen Spiegel auf den Kortex gelenkt. Das Licht wird vom Kortex reflektiert und nach der Passage des dichromatischen Spiegels wird es hochpassgefiltert ($>665\text{nm}$). Der an die Membran gebundene spannungssensitive Farbstoff hat eine Anregungswellenlänge von 630 nm und sein Emissionsspektrum ist $> 670 \text{ nm}$. Durch den Hochpassfilter wird gewährleistet, dass nur Licht emittiert von den an die Membran gebundenen Farbstoffmolekülen die Sensoren der Kamera erreicht.

Das Imaging in der frühen Experimentphase (Experimente 140709 und 121409) wurde unter den gleichen Bedingungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde jedoch eine andere Kamera verwendet (Dalsa 1M60P). Die Framerate betrug 160Hz bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln mit einer Sensorgröße von 12x12 μm pro Pixel. Mit Hilfe des Aufnahmesystems konnte somit eine kortikale Fläche von 12x12 mm abgeleitet werden. Um die SNR zu erhöhen wurde ein 4-faches Binning angewendet und die Pixelgröße vergrößert sich so auf eine Fläche von 48x48 μm .

5.2.5 Synchronisation

Um die optischen und elektrophysiologischen Daten simultan ableiten zu können, bedarf es einer exakten Synchronisation aller beteiligten Aufnahmesysteme (*Abbildung 14*).

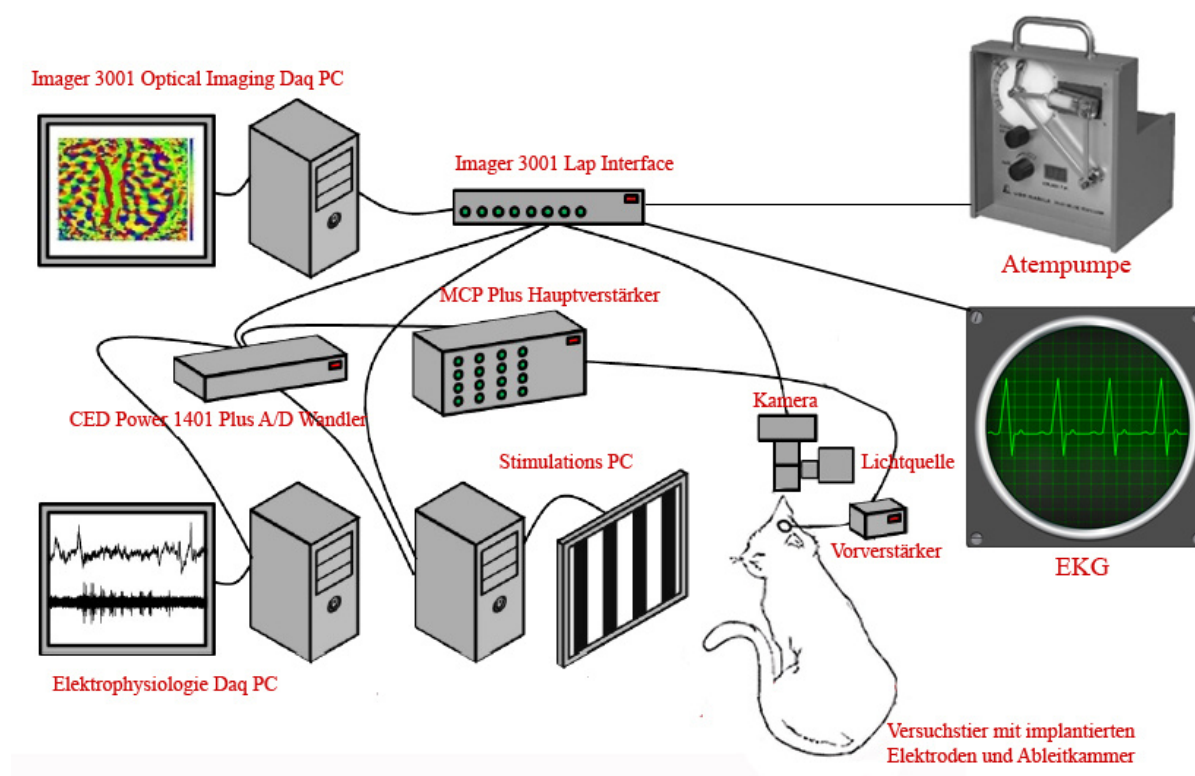


Abbildung 14: Synchronisation der Aufnahmesysteme

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Aufnahmeeinheit der Kamera war synchronisiert mit der Atempumpe und dem EKG des Versuchstiers. Der Startpunkt einer Aufnahmesequenz wurde getriggert auf den Wendepunkt der QRS-Zacke des EKGs und die Atempumpe war während der Aufnahme ausgeschaltet. Die Ableitung der optischen und elektrophysiologischen Daten erfolgte simultan.

Um eine Analyse auf Single Trial Niveau zu ermöglichen, ist eine hohe Datenqualität notwendig. Biologische Artefakte resultierend aus Atmung und Herzschlag können durch eine technisch aufwendige Synchronisation des Aufnahmesetups vermieden werden. Für die Experimente wurde folgende Befehlskette programmiert:

Um eine Aufnahmesequenz einzuleiten, wird die Aufnahmeeinheit (Imager 3001) der Kamera aktiviert. Nach der Aktivierung werden noch keine Bilder akquiriert, da zunächst ein TTL Impuls ausgehend vom Imager 3001 an die triggerbare Atempumpe gesendet wird. Die Atempumpe stoppt nach Beendigung des Beatmungszyklus, geht in Warteposition und sendet einen TTL Impuls zurück an den Imager 3001. Der Imager 3001 synchronisiert sich mit EKG und ist nun bereit die Datenaufnahme zu starten, wartet aber noch bis die QRS-Zacke des EKGs ihren Wendepunkt erreicht. Über simultane TTL Impulse aktiviert der Imager 3001 nun die Kamera, den Stimulationscomputer und die Aufnahmeeinheit der Elektrophysiologie. Während der 1-2 Sekunden andauernden Aufnahme bleibt die Atempumpe ausgeschaltet, was zur Folge hat, dass kein Artefakt, das aus dem Atemzyklus resultiert, entstehen kann. Durch die Synchronisation des Imager 3001 mit dem EKG startet eine Aufnahmesequenz immer zur gleichen Phase des Herzschlags. Durch Subtraktion eines *Blank-Trials* kann das Herzschlagartefakt beseitigt werden (siehe Exkurs VSD). Als Interstimulusintervall wurde ein Zeitraum von 50 Sekunden eingestellt. Das Intervall ist lange genug, dass toxische Abbauprodukte des Farbstoffs im Gewebe abtransportiert werden können, um so lokal Gewebeschädigungen zu vermeiden.

Eine technisch aufwendige Synchronisation wie zuvor beschrieben war in der frühen Experimentphase mit der Kamera Dalsa 1M60P (Experimente 140709 und 121409) noch nicht möglich, da die Atempumpe nicht triggerbar war. Eine Aufnahmesequenz wurde hier eingeleitet durch den Imager 3001, der über einen TTL Impuls den Stimulationscomputer startete, welcher anschließend die Aufnahmeeinheit der Elektrophysiologie aktivierte.

5.3 Elektrophysiologische Ableitung

Die abgeleiteten Signale der Wolfram-, Faden- und EEG-Elektroden wurden zunächst durch einen Vorverstärker nahe der Ableitquelle zehnfach vorverstärkt und Impedanz gewandelt, um den Einfluss von Störsignalen möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Signale im Hauptverstärker (MCP-Plus, Alpha Omega Engineering, Israel) nochmals um den Faktor 500-1000 verstärkt. Die Hauptverstärker sind mit Analogfiltern bestückt, die die Signale durch Tief- und Bandpassfilterung in zwei Signalkomponenten zerlegt. Aus der Tiefpassfilterung resultieren die LFP und EEG Signale, die einen Frequenzbereich von 0,1-

120 Hz umfassen. Die Bandpass gefilterten Multi-Unit-Signale (MUA) umfassen einen Frequenzbereich von 800-5000 Hz. Die gefilterten Signale wurden anschließend durch zwei A/D-Wandler (1401, Cambridge Electronic Design Limited, UK) digitalisiert - die LFP und EEG Signale mit einer Abtastrate von 1000 Hz, die Multi-Unit-Signale mit 20 kHz. Mit Hilfe der zur 1401 zugehörigen Analyse – und Steuerungssoftware Spike 2 (Version 6.05, Cambridge Electronic Design Limited, UK) wurden die LFP-, EEG- und Multi-Unit-Signale auf einem Computer visualisiert und gespeichert.

5.4 Exkurs: Technische Aspekte des VSD Imagings

Mit Hilfe des *Voltage Sensitive Dye Imagings* kann man die Aktivität vieler tausend Neurone simultan in räumlich hoher Auflösung aufzeichnen. Analysiert man die aufgezeichneten Daten nicht hoch gemittelt, sondern auf Single Trial Niveau, ist eine hohe Trial-to-Trial Variabilität auffällig, die auf spontane Schwankungen in der Amplitude des Signals zurückzuführen sind. Faktoren, welche die Amplitude beeinflussen können, sind zum einen die Spontanaktivität der Neurone und zum anderen technische und biologische Störsignale. Um zu klären, welche Faktoren meine Daten beeinflussen, wurden zunächst intensiv alle Störsignale studiert, die das *Imaging* limitieren. Mit Hilfe der *Independent Component Analyse* (ICA) lassen sich biologische Störsignale aus den Messdaten beseitigen (Maeda et al., 2001, Inagaki et al., 2003). Technisch bedingte Störsignale lassen sich allerdings nur durch eine Optimierung der Aufnahmetechnik minimieren. Daher wird im Folgenden näher auf die technischen Aspekte und die Voraussetzungen für ein optimales (rauscharmes) VSD Imaging mit hoher SNR eingegangen.

Die Störsignale einer Kamera können vereinfacht wie folgt beschrieben werden:

$$\text{Overall Noise} = \sqrt{(\text{Read Noise})^2 + (\text{Dark Noise})^2 + (\text{Shot Noise})^2}$$

Quelle: (ANDOR, 2009)

Read Noise:

Wenn Photonen auf den CCD Sensor der Kamera treffen, werden durch die Energie der Photonen Elektronen aus dem Halbleiter des Sensors herausgestoßen. Während der Belichtungszeit werden diese Ladungen innerhalb eines jeden Pixels akkumuliert. Anschließend werden die akkumulierten Ladungen registerweise mit einer Ausleserate von

z.B. 5 MHz ausgelesen. Das Auslesen mit solch hohen Geschwindigkeiten ist technisch nicht mit einem Wirkungsgrad von 100% umsetzbar, daher entsteht durch das Auslesen ein Störsignal, was als technisches Rauschen bezeichnet wird. Der *Read Noise* ist ein intrinsisches Störsignal des CCD-Chips und kann daher nicht minimiert werden. Der das Voltage Sensitive Dye Imaging maßgeblich limitierende Faktor ist aber der *Shot Noise*. Im Vergleich dazu ist der *Read Noise* prozentual so gering, dass er beim VSDI nicht ins Gewicht fällt.

Dark Noise:

Um neuronale Aktivität zeitlich hochaufgelöst aufzeichnen zu können, wählt man je nach Versuchsvorhaben eine Aufnahmefrequenz zwischen 100 und 1000 Hz. Bedingt durch die hohe Aufnahmegeschwindigkeit erwärmt sich der CCD Chip der Kamera. Die Energiezufuhr bedingt durch die Erwärmung wiederum reicht aus, dass spontan Elektronen aus dem Halbleiter des Chips gestoßen werden. In Abhängigkeit zur Temperatur der Kamera entsteht ein Bildrauschen in den aufgezeichneten Messdaten. Dieses Störsignal limitiert vor allem Methoden wie das Single Cell Imaging, bei welchen die Lichtausbeute und somit die Anzahl der Photonen sehr niedrig ist. Ideale Kameras für das *Low Light Imaging* werden im Vakuum auf minus 80 Grad Celsius heruntergekühlt, was den *Dark Noise* ignorierbar macht. Beim *Voltage Sensitive Dye Imaging* jedoch wird mit extrem viel Licht gearbeitet, daher reicht eine passive Kühlung der Kamera bei einer Raumtemperatur von ca. 20° Celsius aus.

Shot Noise:

Wie schon erwähnt ist dieses Störsignal der limitierende Faktor des VSD Imagings, denn in seiner Amplitude ist der *Shot Noise* um mindestens den Faktor 100 größer als *Read-* und *Dark Noise*. Der *Shot Noise*, auch als Schrotrauschen bezeichnet, entsteht durch zeitliche und räumliche Fluktuationen im Licht. Im idealen Fall würden die Photonen senkrecht auf den CCD Sensor eintreffen. Durch die natürliche Streuung des Lichts werden Photonen abgelenkt und treffen so zeitlich und räumlich randomisiert auf Nachbarpixel, was ein Bildrauschen zur Folge hat. Diese Art von Bildrauschen wird auch als „*Salt and Pepper Noise*“ bezeichnet. Mathematisch lässt sich der *Shot Noise* wie folgt beschreiben:

$$\text{Shot Noise} = \sqrt{\text{Signal}}$$

Und die resultierende Formel für das Signal-Rausch-Verhältnis ist somit:

$$\frac{\text{Signal}}{\text{Shot Noise}} = \frac{\text{Signal}}{\sqrt{\text{Signal}}} = \sqrt{\text{Signal}}$$

Quelle: (ANDOR, 2009)

Würde ein Signal nun z.B 10 Photonen/pro Pixel beinhalten, wäre die SNR 3,16 zu Eins. Ein 100 Photonensignal ergibt eine SNR von 10 zu Eins und bei einem Arbeiten unter sehr hohen Lichtverhältnissen, resultiert aus einer Anzahl von 1.000.000 Photonen eine theoretische SNR von 1000 zu Eins. Das mit Hilfe der spannungsabhängigen Farbstoffe zu messende neuronale Signal entspricht in etwa einem Tausendstel der gesamten Lichtmenge (Shoham et al., 1999). Daher wäre die tatsächliche SNR bei einer Photonenmenge von 1.000.000 gerade mal Eins zu Eins. Um nun die SNR zu erhöhen, kann man viele Aufnahmen aufmitteln, wodurch das Artefakt des zufällig verteilten *Shot Noise* minimiert wird. Oder aber man arbeitet unter sehr hohen Lichtverhältnissen mit einer Anzahl von mehr als 1.000.000 Photonen pro Pixel, um Analysen auf *Single Trial* Niveau zu ermöglichen. Dies wiederum erfordert Kameras mit Speziialsensoren, die in der Lage sein müssen, die aus den von Millionen von Photonen pro Pixel resultierenden Elektronen akkumulieren zu können. Der Wert, der die Anzahl an möglichen zu akkumulierenden Elektronen pro Pixel einer Kamera bezeichnet, wird als *well depth* eines Pixels bezeichnet. Ist die *well depth* des Chips geringer als die eintreffende Lichtmenge, wird der CCD Chip übersättigt. Die resultierenden Pixel auf dem Messbild erscheinen weiß, und es können keine Rückschlüsse mehr auf die Amplitude des eigentlichen neuronalen Signals gezogen werden. Um die *well depth* eines Pixels zu erhöhen gibt es zwei Möglichkeiten, entweder der Kamerahersteller verbaut sehr große Pixel oder aber man macht ein räumliches *Binning*. *Binning* bedeutet, dass nicht jeder Pixel einzeln ausgelesen wird, sondern dass z.B. die einfallende Lichtmenge über 4 Pixel integriert wird und diese 4 Pixel anschließend als 1 Makropixel ausgelesen werden. Die Methoden zur Erhöhung der *well depth* sind unterschiedlich, generell gilt jedoch, dass eine hohe *well depth* eines Sensors eine Verringerung der räumlichen Auflösung nach sich zieht. Übliche Sensoren für das VSD Imaging haben eine Auflösung zwischen 100x100 und 600x600 Pixeln.

Die letzte hier zu erwähnende Komponente, die den *Shot Noise* und somit die SNR beeinflusst, ist die sogenannte *Quantum Efficiency (QE)* eines Pixels. Die QE kann man gut mit dem Wirkungsgrad vergleichen. Wäre die QE 100%, würden 100% aller eintreffenden Photonen in Elektronen umgewandelt. Dies ist technisch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht umsetzbar. Zusätzlich hat ein Pixel bautechnisch bedingt eine mechanische Umrandung, die ihn von Nachbarn isoliert. Im Bereich der Isolation können keine Photonen umgewandelt werden, daher kann die Fläche des Chips nicht zu 100% zur Detektion von Photonen genutzt werden. Der sogenannte *fill factor* beschreibt prozentual die lichtsensitive Fläche eines Pixels. Um eine geeignete Kamera zu finden, müssen alle genannten Faktoren berücksichtigt werden.

Zusammengefasst ergibt sich daher folgende Formel für die SNR:

$$\frac{\text{Overall Signal}}{\text{Noise}} = \frac{\frac{QE}{100} \times \text{Photon Signal}}{\sqrt{(\text{Read Noise})^2 + (\text{Dark Noise})^2 + (\frac{QE}{100} \times \text{Photon Signal})}}$$

Quelle: (ANDOR, 2009)

Die Daten, die mit Hilfe der ICA (Experimente Phase 1) bereinigt wurden, wurden mit einer Kamera (Dalsa 1M60P) aufgenommen, die eine *well depth* von 3,5 Millionen Elektronen pro Pixel und eine QE von 15 % im Wellenlängenbereich > 670 nm besitzt. Um die Einflüsse der neuronalen Spontanaktivität studieren zu können, müssen sehr niedrige Amplituden auf Single Trial Niveau von der Kamera detektiert werden können. Die in den Experimenten der Phase 1 verwendete Kamera ist für eine Analyse auf Single Trial Niveau technisch bedingt nicht ideal. Daher wurde nach meinem Studium aller zuvor beschriebenen relevanten Störsignale ein neues Kamerasystem in das Setup integriert. Die QE der neuen Kamera (Photon Fokus MV1 D1312) liegt im Wellenlängenbereich > 670 nm bei mindestens 60% und die *well depth* pro Pixel beträgt bis zu 15,6 Millionen Elektronen. Aufgrund der sehr hohen *well depth* und der hohen QE kann man mit sehr viel Licht arbeiten und so die Limitationen des *Shot Noise* umgehen, was wiederum Voltage Sensitive Dye Experimente von einer hohen SNR ermöglicht.

Um die biologischen Artefakte durch Atmung und Herzschlag zu minimieren, wurde neben der Anschaffung eines neuen Kamerasystems für die Experimente der Phase 2 eine triggerbare Atempumpe in das System integriert (*Abbildung 14*) und das EKG mit der Aufnahmeeinheit synchronisiert. Durch die Synchronisation von Atmung und EKG mit der Aufnahmeeinheit konnten mit Hilfe des neuen Kamerasystems Experimente durchgeführt werden, die nahezu frei von biologischen Artefakten sind. Da auch die technischen Störquellen deutlich reduziert wurden, war es in den Experimenten 112511 und 030512 aufgrund der hohen SNR möglich, neuronale Spontanaktivität sicher zu identifizieren und zu analysieren.

5.5 Datenanalyse

Die Analyse aller optischen und elektrophysiologischen Daten erfolgte anhand eigens entwickelter Matlab Routinen (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

5.5.1 Analyse der optischen Daten

Normalisierung

Bevor die optischen Daten analysiert werden können, müssen sie durch 3 Schritte vorprozessiert werden (Shoham et al., 1999, Meirovithz et al., 2010, Onat et al., 2011).

Schritt 1:

Um Unterschiede in der Beleuchtung innerhalb aller Pixel zu entfernen, wurden das arithmetische Mittel aus den letzten 10 Frames vor Stimulus Beginn gebildet. Alle Bilder der Aufnahmesequenz wurden anschließend durch dieses gemittelte Bild dividiert. Helligkeitsunterschiede, die aus der Wölbung des Kortex resultieren, wurden so ausgeglichen und alle Pixel auf 1 normalisiert.

Schritt 2:

Durch Subtraktion des arithmetischen Mittels aller *Blank-Trials* von den *Single Trials* mit visueller Stimulation wurde das Herzschlagartefakt beseitigt. Das Herzschlagartefakt ist in jedem Trial gleich, da die Aufnahmesequenz immer mit dem EKG synchronisiert war und somit die herzschlagabhängigen Blutvolumenverschiebungen im Gewebe immer relativ zur Aufnahmesequenz den gleichen Verlauf nehmen sollten. Des Weiteren hat die Subtraktion des aufgemittelten *Blanks* den Vorteil, dass die Problematik des Bleachings minimiert wird. Durch die starke Beleuchtung des Kortex werden Farbstoffmoleküle zerstört, wodurch innerhalb einer Aufnahmesequenz die Amplitude des Signals stark abfällt. Das Bleaching der *Blank-Trials* und der Trials unter Stimulation verhält sich annähernd gleich, wodurch die Möglichkeit eröffnet wird, den Abfall der Amplitude durch Subtraktion auszugleichen (*Abbildung 15*).

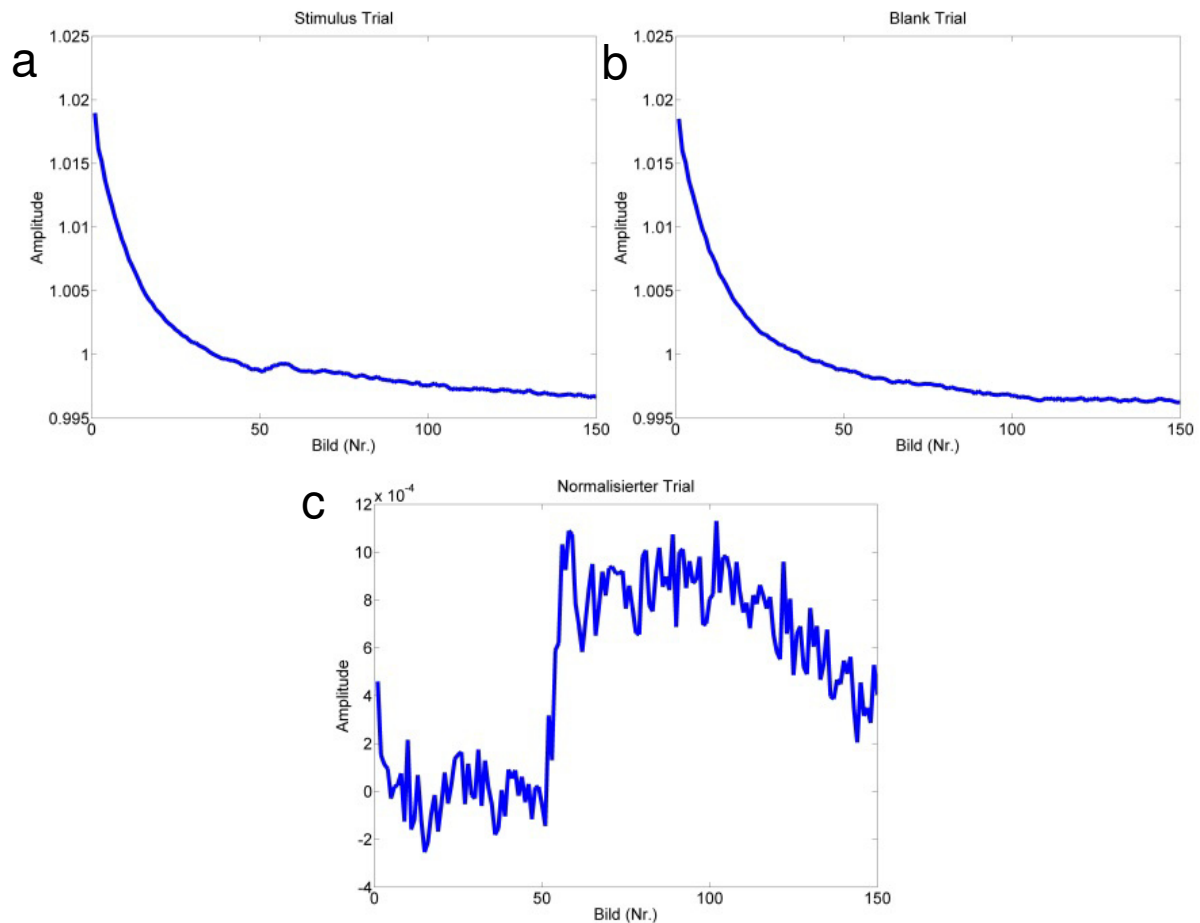


Abbildung 15: Normalisierung der optischen Daten

Durch Subtraktion des Blanks (b) von den Aufnahmesequenzen mit Stimulation (a) werden die Artefakte resultierend aus dem Herzschlag des Versuchstiers und dem Ausbleichen des Farbstoffs beseitigt (c). Abbildung (c) zeigt die neuronale Aktivität gemittelt über alle Pixel einer Aufnahmesequenz. Während der Frames 1-50 wurde dem Versuchstier ein grauer Bildschirm gezeigt und ab Frame 51 erfolgte die visuelle Stimulation durch ein bewegtes Balkenmuster.

Schritt 3:

Um hoch- und tieffrequentes Rauschen innerhalb der Pixel eines jeden Bildes zu beseitigen und die kolmnäre Aktivität hervorzuheben, wurden alle Aufnahmen räumlich Bandpass gefiltert (LP = 168 μm ; HP = 960 μm).

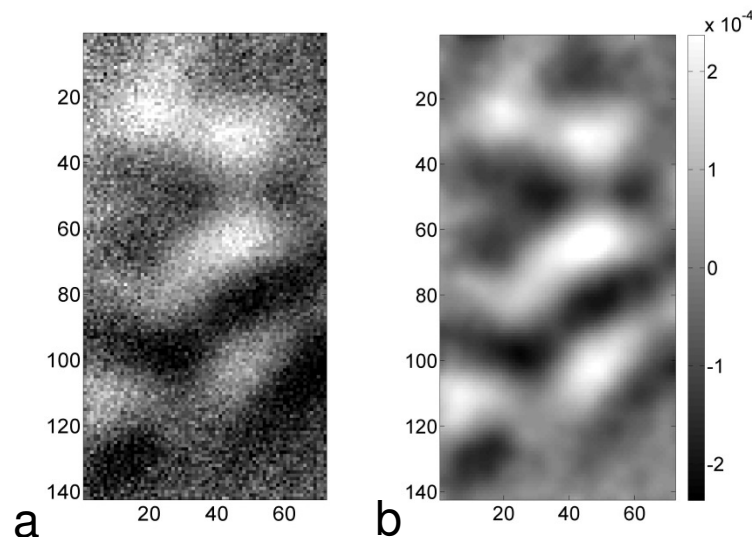


Abbildung 16: Die Bandpassfilterung optischer Karten

a) Dargestellt ist die evozierte Aktivität hervorgerufen durch bewegte Balkenmuster. Die resultierende Karte wurde nicht räumlich bandpassgefiltert. b) Dargestellt ist gleiche Karte wie in a) abgebildet, allerdings nach der räumlichen Bandpassfilterung.

Optische Karten

Ein Kamerabild, das räumlich die neuronale Aktivität des Kortex zeigt, wird als Karte bezeichnet.

Werden die Kamerabilder während der Stimulationsphase eines einzelnen Trials zeitlich gemittelt, wird das Ergebnis als **Single Trial Karte** bezeichnet. Die Single Trial Karte reflektiert die Kombination aus evozierter und spontaner Aktivität.

Mittelt man die Karten einer Stimulusbedingung über viele Trials, wird das Ergebnis hier als **optimale Karte** bezeichnet, da technische Störsignale und Einflüsse durch die Spontanaktivität herausgemittelt wurden. Eine optimale Karte reflektiert die evozierte Aktivität hervorgerufen durch den Stimulus.

Populationsaktivität

Um die neuronale Aktivität zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit als Maß die *Populationsaktivität* verwendet. Um die Populationsaktivität zu bestimmen, musste zunächst eine ROI (*region of interest*) ermittelt werden, die nur informative Pixel mit einer hohen SNR

enthält. Aufgrund der Wölbung des Kortex liefern die Pixel aus den Randbereichen des Bildes nur ein sehr schwaches Signal. Diese Pixel haben eine geringe SNR und weisen trotz der unterschiedlichen dargebotenen Stimuli keine deutlich erkennbare evozierte Aktivität auf. Um diese Pixel aus der Analyse auszuschließen, wurde eine ROI nach folgender Formel berechnet:

$$SNR_p = \frac{|\langle x_p(t_2) \rangle_{t_2 \in Signal} - \langle x_p(t_1) \rangle_{t_1 \in Noise}|}{Std(x_p(t_1))_{t_1 \in Noise}}$$

(Gilad et al., 2012)

$x_p(t_1)$ und $x_p(t_2)$ reflektieren das Signal eines Pixels über die Zeit, aufgemittelt über alle Trials. $t_{2 \in Signal}$ entspricht der Stimulationsphase und $t_{1 \in Noise}$ reflektiert den Zeitraum der Baseline, also dem Zeitraum vor Einsatz der Stimulation. Die Einheit der Aktivität eines Pixels ist nach dieser Formel die Standardabweichung. Pixel mit einer Standardabweichung > 2.5 wurden als Pixel mit einer hohen SNR gewertet. Alle Pixel einer hohen SNR ergeben schließlich die ROI. Die Populationsaktivität ist die Aktivität aller Pixel innerhalb der ROI.

5.5.2 Auswertung der Experimente Phase 1

5.5.2.1 Independent Component Analyse

Versuchsziel: Entfernung biologischer Artefakte zur Optimierung der Datenqualität

Die mittels VSD abgeleiteten Daten aus den Experimenten 140709 und 141409 sind eine Kombination aus Stimulus evozierter Aktivität, dem Herzschlagartefakt, dem Artefakt stammend aus der Atmung, neuronaler Spontanaktivität und technisch bedingtem Rauschen durch die Kamera. Die Aktivität jedes Pixels $X(t)$ ist ein linearer Mix aus voneinander statistisch unabhängigen Signalen wie z.B. der neuronalen Aktivität und den zuvor beschriebenen Artefakten. Die *Independent Component Analyse* (ICA) ist eine statistische Methode, um die voneinander unabhängigen Signale aus dem abgeleiteten Gesamtsignal zu separieren. Der in dieser Arbeit hinzugezogene *Fast ICA* Algorithmus wurde in Helsinki entwickelt (Hyvarinen, 1999) und zuvor schon erfolgreich in Experimenten mit Meerschweinchen und Photodiodenarrays angewendet (Maeda et al., 2001, Inagaki et al., 2003). Dabei wurde ein 12x12 Photodiodenarray (144 Pixel) eingesetzt und von allen Pixeln wurde erfolgreich das Herzschlagartefakt entfernt. In unserem Ansatz wurde eine CCD

Kamera mit deutlich höherer Auflösung eingesetzt und der Algorithmus der ICA auf ~ 5000 Pixel angewendet.

Um die Methodik näher zu veranschaulichen, soll zunächst ein einfaches Beispiel herangezogen werden. Die ICA soll in diesem Beispiel hypothetisch auf die akustischen Signale, die von einer Musikband produziert werden, angewendet werden, um die Signale der einzelnen Instrumente mit Hilfe der ICA zu separieren. Würde man die Musik dieser hypothetischen Musikband mit nur einem Mikrofon aufzeichnen, wäre die ICA nicht in der Lage, die Signale der Instrumente voneinander zu trennen. Die Musik ist mathematisch ausgedrückt ein linearer Mix aller Instrumente. Würde man hingegen 50 Mikrofone um die Band herum positionieren, würden daraus 50 Musikkanäle entstehen, die wiederum aus dem linearen Mix aller Instrumente bestehen. Allerdings sind diese 50 Kanäle unterschiedlich, da das Mikrofon nahe am Gitarristen wenig Signal des Schlagzeugers empfängt, das Mikrofon vor dem Schlagzeuger wiederum zeichnet bedeutend mehr Bass der Trommeln als Gitarre auf und das mittig positionierte Mikrofon empfängt akustische Signale beider Bandmitglieder. Die simultanen Aufnahmen aller Mikrofone können nun miteinander verglichen werden. Mit Hilfe des Algorithmus der ICA ist es möglich, die einzelnen Instrumente zu separieren, da die Signale des Gitarristen und die des Schlagzeugers voneinander unabhängig sind. Übertragen auf meine Methodik soll die ICA angewendet werden, um die neuronalen Signale von den Störsignalen voneinander zu trennen, da beide voneinander unabhängig sind.

In der Praxis gibt es aufgrund der hohen Anzahl von Pixeln eine sehr hohe Anzahl von unabhängigen Signalen. Da die ICA hier nur genutzt wird, um die Störsignale vom neuronalen Signal zu trennen, wurde mit Hilfe der *Principal Component Analyse* (PCA) die Dimensionalität der Daten reduziert. Eine Komprimierung des Signals auf seine neun Hauptkomponenten ermöglicht ein erfolgreiches Auffinden der zugrunde liegenden unabhängigen Signale von Interesse, da durch die Kompression der PCA noch immer mehr als 95% der Energie des Signals erhalten bleibt (Inagaki et al., 2003).

Mathematisch ausgedrückt ist die ICA eine Technik der Signalprozessierung, um die unabhängigen Signale $S(t)$ aus der Linearkombination aller Komponenten zu finden, gemäß der Formel:

$$X(t) = A \times S(t)$$

$X(t)$ = Amplitude eines Pixels über die Zeit (Linearkombination aller unabhängigen Signale über die Zeit)

$S(t)$ = Matrize, welche die Amplitude der statistisch unabhängigen Komponenten des Signals über die Zeit beinhaltet.

A = Matrize aus Faktoren, welche die Gewichtung der einzelnen unabhängigen Komponenten des Signal beinhaltet. Die Linearkombination, also die Summe aus dem Produkt aller unabhängigen Komponenten $S(t)$ multipliziert mit der jeweiligen Gewichtung aus der Matrix A ergibt das ursprüngliche Signal $X(t)$.

Daraus folgt für einen Pixel über die Zeit:

Für alle Pixel (X_i) und alle Komponenten (S_j) gilt:

$$X_i(t) = \sum_j A_{ij} S_j(t)$$

A_{ij} ist somit die Gewichtung der unabhängigen Komponente j im entsprechenden Pixel i .

Vorgehensweise:

Im zuvor beschriebenen Beispiel wurden die akustischen Signale der Band mit Mikrofonen aufgezeichnet, ein Mikrofon wurde als Kanal bezeichnet. Übertragen auf die optischen Daten entspricht ein Mikrofon einem Pixel des CCD Chips und ein Kanal dem Verlauf der Amplitude eines aufgezeichneten Pixels über die Zeit. Bei einer Anzahl von ~ 5000 Pixeln stehen somit ~ 5000 Kanäle zum Extrahieren der statistisch unabhängigen Komponenten zur Verfügung. Eine Grafik soll die Vorgehensweise verdeutlichen:

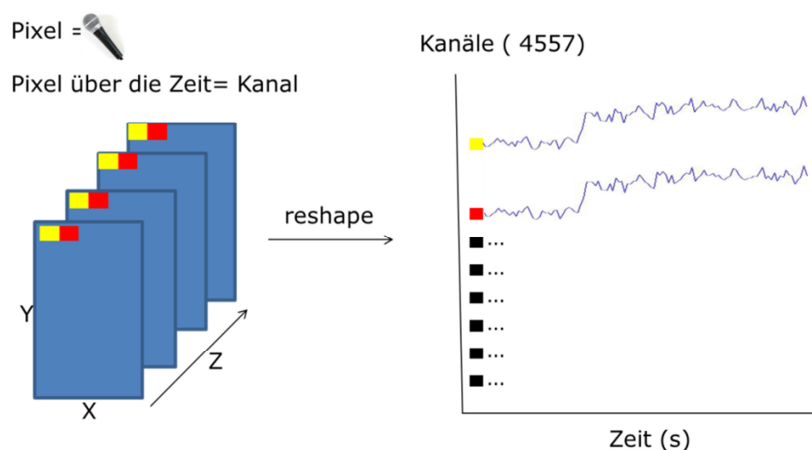


Abbildung 17: Die Independent Component Analyse

Schematisch ist die Vorprozessierung der Daten für die ICA-Analyse dargestellt. Ein Pixel über die Zeit wird als Kanal bezeichnet. Alle Pixel über die Zeit wurden in eine zweidimensionale Matrix transformiert und der Independent Component Analyse unterzogen.

Nachdem alle Kanäle der Independent Component Analyse unterzogen wurden, kann der Zeitverlauf der gefundenen 9 unabhängigen Komponenten ermittelt werden. (*Abbildung 27 Ergebnisteil*)

Um nun zu ermitteln, welche der statistisch unabhängigen Signalkomponenten das biologische Störsignal des Herzschlags beinhaltet, wurden alle Komponenten einer Fourieranalyse unterzogen und ihre Power im Spektralbereich zwischen 2-3 Hz ermittelt, da dieser Frequenzbereich dem Herzrhythmus der Katze entspricht. Zu erwarten ist, dass eine Komponente, die dem Herzschlag entspricht, einen hohen Beitrag im Bereich von 2-3 Hz aufweist. Wenn die Power einer Komponente den Schwellenwert von 30% der absoluten Power überschritt, wurde diese Komponente als das Herzschlagartefakt identifiziert (*Abbildung 28 Ergebnisteil*).

Um das vom Herzschlagartefakt befreite Signal zu erhalten, werden alle Komponenten bis auf die des Herzschlags wieder zusammengesetzt. Da die Summe der statistisch unabhängigen Signalkomponenten die Linearkombination des Ursprungssignals ist, können alle Komponenten, außer der des Herzschlags summiert werden. Das entstandene Signal $X(t)$ beinhaltet alle Signalkomponenten außer der des Herzschlagartefakts.

Mit Hilfe der ICA wurden 458 Trials aus zwei Experimenten vom Herzschlagartefakt bereinigt und die korrespondierenden Single Trials mit den hoch aufgemittelten Karten korreliert. Anschließend wurden die Korrelationskoeffizienten der bereinigten Daten mit den Koeffizienten der unbereinigten Daten verglichen (*Ergebnisteil Abbildung 30*).

Vor der Anwendung des ICA-Algorithmus auf die biologischen Daten wurde seine Funktionalität zunächst anhand von modellierten Daten verifiziert.

ICA Modell

Um zu überprüfen, ob der in meiner Datenauswertung implementierte Algorithmus der Independent Component Analyse prinzipiell dazu in der Lage ist, ein neuronales Signal von Störsignalen zu trennen, wurde er zuerst an modellierten Daten getestet. Im Gegensatz zu einem *in vivo* Experiment hat das Modell den Vorteil, dass jede Komponente des Signals bekannt ist und das Ergebnis nicht interpretiert werden muss. Man hat so die Möglichkeit, einzelne Signale linear miteinander zu vermischen und kann dann überprüfen, ob der Algorithmus die ursprünglichen Signale aus dem Mix von Signalen wieder separieren kann.

Mit Hilfe von Matlab wurden dafür künstlich 3 Signale erstellt, die das Herzschlagartefakt, den *shot noise* und ein synthetisches neuronales Signal simulieren. Anschließend wurden alle Signale linear miteinander vermischt und das daraus resultierende Signal mit Hilfe der ICA analysiert. Der zugrunde liegende Code des ICA Algorithmus für meine Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jochen Triesch (Frankfurt Institute For Advanced Studies) entwickelt.

5.5.3 Auswertung der Experimente Phase 2

5.5.3.1 Analyse der Spontanaktivität

Fragestellung: Gibt es Muster in der Spontanaktivität?

Insgesamt wurden über 50.000 Kamerabilder, welche die spontane Aktivität des Kortex darstellen, analysiert. Die Anzahl der Bilder ist zu hoch, um mit dem bloßen Auge nach Mustern innerhalb der Spontanaktivität zu suchen. In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass spontane Muster neuronaler Aktivität innerhalb des unstimulierten Kortex erscheinen, die über einen Zeitraum von bis zu 200 ms stabil sind und den Stimulus-induzierten Aktivitäten sehr stark ähneln (Kenet et al., 2003). Um diese Muster in meinen Daten nachzuweisen, wurde ein in der Literatur beschriebener Clusteralgorithmus verwendet (Kohonen, 2001), der von einem von mir betreuten Studenten (Daniel Hofmann) im Rahmen eines Praktikums als Matlab-Routine programmiert wurde. Der Clusteralgorithmus wird als Kohonen-Algorithmus bezeichnet und für die mathematischen Hintergründe zu diesem Algorithmus verweise ich auf das Buch *Kohonen Self-organizing maps* von Teuvo Kohonen (Kohonen, 2001).

Der Algorithmus wurde in dieser Arbeit dazu genutzt, die Ähnlichkeitsbeziehung aller Bilder zueinander zu ermitteln. Über die pixelweise Bestimmung der euklidischen Distanz zwischen zwei Bildern kann die Ähnlichkeit der Bilder zueinander bestimmt werden. Ist die Ähnlichkeit hoch, ist die euklidische Distanz gering. Vergleicht man nun alle Bilder untereinander und bestimmt von jedem zu jedem die euklidische Distanz, kann eine Ähnlichkeitsbeziehung zueinander errechnet werden. Jedem einzelnen Bild wird ein Index zugeordnet, Bilder mit einer Ähnlichkeitsbeziehung zueinander haben folglich einen gleichen oder ähnlichen Index. Trägt man nun die Indexnummern aller Bilder in einem Graph auf, kann daraus abgelesen werden, welche Bilder sich ähneln. Ein einzelnes Bild in meinen Experimenten reflektiert zeitlich die neuronale Aktivität über einen Zeitraum von 6,7 ms. Wenn es innerhalb der

Spontanaktivität stabile Muster gäbe, die über einen Zeitraum von z.B. 200 ms andauern, dann würde dies einer Anzahl von ca. 30 Bildern hintereinander mit ähnlicher Indexnummer entsprechen. Eine solche Akkumulation ähnlicher oder gleicher Indexnummern ist identifizierbar und wird als *Cluster* bezeichnet. Mit dieser Methodik war es möglich, die Anzahl von über 50.000 Kamerabildern auf spontane metastabile Muster hin zu untersuchen. Aufgrund der Indexierung konnte nach *Clustern* gesucht werden, wodurch sich die Dimension des Datensatzes verkleinerte.

Die Funktionalität des Algorithmus wurde zunächst an hoch gemittelten Daten getestet. Es wurde überprüft, ob der Algorithmus unterschiedliche Stimulationsphasen und die Baseline getrennt voneinander zu *clustern* vermag. Anschließend wurde das Clustervermögen des Algorithmus an unterschiedlichen *Single Trial* Daten und schlussendlich an Daten, die nur die Spontanaktivität beinhalteten, getestet. Die Ergebnisse der Tests und die Suche nach Mustern innerhalb der Spontanaktivität sind im Ergebnisteil im Detail dargestellt.

5.5.4 Elektrophysiologie

5.5.4.1 Spontanaktivität PMLS

Um die spontane Feuerrate in PMLS zu ermitteln, musste zunächst definiert werden, ab welcher Schwelle oberhalb des Grundrauschens des Signals ein Aktionspotential (Spike) als Spike gilt. Die Schwellen wurden für alle Kanäle unter visueller Kontrolle per Hand gesetzt. Zur Bestimmung der spontanen Feuerrate wurde die Anzahl der Spikes im Zeitfenster 500 ms vor Stimulationsbeginn für jeden Trial berechnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Daten stammen von der Elektrode, die das höchste Signal-Rauschen-Verhältnis aufwies.

5.5.4.2 Analyse der oszillatorischen Aktivität

Eine aktuelle Hypothese besagt, dass während Phasen von hoher Alphaaktivität in den okzipitalen Arealen des Kortex die Erregbarkeit der Neurone reduziert ist (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013). Durch einen direkten Nachweis konnte diese Hypothese bislang allerdings noch nicht belegt werden. Die Amplitude des spannungsabhängigen Farbstoffsignals reflektiert vor allem die unterschwelligen Membranpotentialveränderungen durch EPSPs und IPSPs im Dendritenbaum von Neuronen. Die Amplitude des VSD-Signals reflektiert somit den Erregungsgrad der optisch abgeleiteten Neurone. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung des VSD Signals kann für jeden Pixel sowohl die Aktivität, also der Erregungsgrad, als auch die Alphaaktivität bestimmt werden. Um die Hypothese von (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013)

zu überprüfen, wurde die Alphaaktivität in Area 18 durch Analyse der optischen Daten, der LFP- und der EEG-Daten bestimmt. Zusätzlich wurde die Alphaaktivität in PMLS durch Analyse des LFPs bestimmt.

Um die spontane oszillatorische Aktivität innerhalb der Testgruppen zu ermitteln, ist für die Daten das gleiche Zeitfenster, wie zuvor beschrieben, verwendet worden (500 ms Baseline vor Stimulusonset). Zur Berechnung der Alphaaktivität wurden die spektrale Zusammensetzung der Daten mit Hilfe der schnellen Fourier Transformation (FFT) bestimmt und die spektrale Leistungsdichte aller Frequenzen bis 100 Hz berechnet. Die spektrale Leistungsdichte (*Spectral Power Density*) eines Frequenzbereichs wird als Power bezeichnet. Die spontane Alhapower eines jeden Trials wurde normalisiert durch die Division der absoluten Power. Die absolute Power ist die Summe der Power aller Frequenzbänder. Als Amplitude resultiert die Einheit *Power* in % der *absoluten Power*.

In die finale Analyse gingen nur die Elektroden mit dem besten Signal-Rauschen-Verhältnis ein.

Analysierte elektrophysiologische Signale der linken Hemisphäre von Experiment 030512:

Elektrode	Areal
Nr. 1	PMLS
Nr. 11	Area 18
Nr. 14 (EEG)	Area 18

Analysierte elektrophysiologische Signale der rechten Hemisphäre von Experiment 112511:

Elektrode	Areal
Nr. 6	PMLS
Nr. 8 (EEG)	Area 18

Zusätzlich wurde die spontan auftretende Alphaaktivität in den optisch abgeleiteten Daten für $n > 1000$ Pixel innerhalb der jeweiligen ROI ermittelt.

5.5.4.3 Kohärenzanalyse

Um eine mögliche Interaktion zwischen PMLS und Area 18 nachzuweisen, wurde zwischen den Elektroden 1 (PMLS) und 11 (Area 18) eine Kohärenzanalyse durchgeführt. Die Kohärenz gibt den linearen Zusammenhang zwischen 2 Signalen an und gilt als Maß der Synchronität zwischen neuronalen Netzwerken.

Mathematisch ausgedrückt ist die Kohärenz das Produkt der gemittelten Kreuzspektren zum Quadrat geteilt durch das Produkt der Autospektren beider Signale:

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{(P_{xx}(f)) \times (P_{yy}(f))}$$

Eine Kohärenz von 1 bedeutet, dass die Phasen zweier neuronaler Populationen identisch sind und sie somit synchron oszillieren. Eine hohe Kohärenz ermöglicht eine effektive Kommunikation zwischen zwei neuronalen Gruppen (Fries, 2005, Schoffelen et al., 2005). Aktive Neurone haben die intrinsische Eigenschaft, zu oszillieren. Diese Oszillationen erzeugen rhythmische Modulationen der Erregbarkeit, was sowohl die Generierung von Spikes als auch den synaptischen Input beeinflusst. Dadurch entstehen zeitliche Fenster für eine Kommunikation. Es wird vermutet, dass nur kohärent oszillierende Populationen von Neuronen effektiv miteinander kommunizieren können, da die zeitlichen Fenster für In- und Output dann gleichzeitig offen sind (Fries, 2005, Schoffelen et al., 2005).

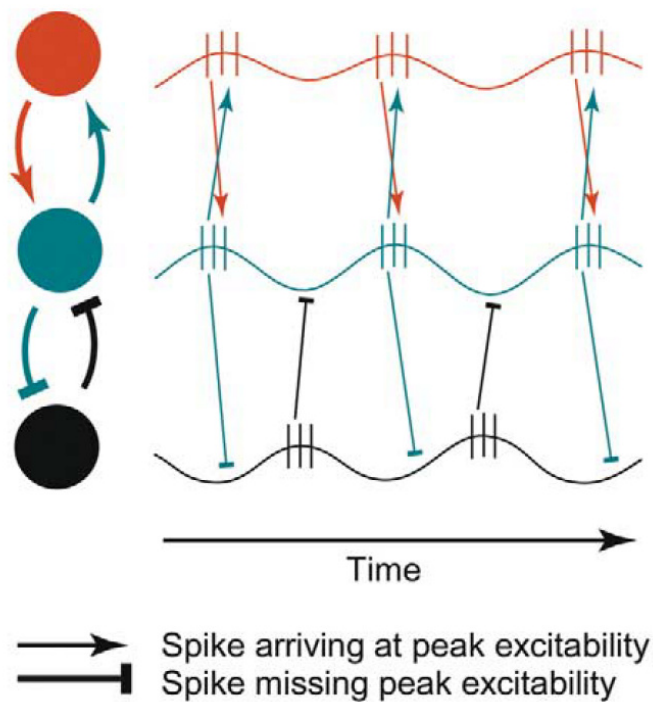


Abbildung 18: Die Kommunikation durch Kohärenz Hypothese

Schematisch dargestellt ist das Prinzip der effektiven Kommunikation durch Kohärenz (Fries, 2005). Eine hohe Kohärenz oder gleichbedeutend eine hohe Synchronizität zwischen der Aktivität zweier neuronaler Populationen ermöglicht eine effektive Kommunikation (Rot+Blau). Die rhythmischen Modulationen der Erregbarkeit erfolgen zwischen diesen Populationen synchron, wodurch zeitliche Fenster für eine effektive Kommunikation entstehen.

Über den Phasenverschiebungswinkel φ der jeweiligen Frequenz (f) kann ermittelt werden, von welchem Netzwerk (PMLS oder Area 18) die Oszillation ausgeht (Bokil et al., 2010) und um welchen zeitlichen Faktor die Phasen zueinander verschoben sind. Dies kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\varphi = 2 \times \pi \times f \times \Delta t \quad \Rightarrow \quad \Delta t = \frac{\varphi}{(2 \times \pi \times f)}$$

5.5.5 Statistik

Test auf Normalverteilung

Um einen geeigneten statistischen Test zur Prüfung der Ergebnisse auf Signifikanz auszuwählen, musste zunächst getestet werden, ob die Daten normalverteilt sind. Der Shapiro-Wilks Test ist ein solcher Test auf Normalverteilung. Der Test hat ergeben, dass die Daten nicht normal verteilt sind, daher wurde zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz ein parameterfreier Test ausgewählt.

Mann-Whitney-U Test

Der Mann-Whitney-U Test ist ein parameterfreier statistischer Test, der für den Vergleich von unabhängigen Stichproben aus 2 Gruppen geeignet ist. Er wurde in dieser Arbeit benutzt, um zu überprüfen, ob die im Ergebnisteil ermittelten Unterschiede zwischen zwei Testgruppen signifikant sind. Ein P-Wert kleiner 5% wurde als signifikant gewertet.

5.5.6 Histologie

Um zu verifizieren, dass die elektrophysiologischen Daten aus dem PMLS Kortex stammen, wurde dieser histologisch aufbereitet und dreidimensional mit Hilfe der Software NeuroLucida (MicroBrightField, Inc., Colchester, USA) rekonstruiert.

Fixierung

Durch die Fixierung sollen nach dem Tode einsetzende autolytische Vorgänge in Zellen und Geweben verhindert werden, so dass Strukturen in möglichst natürlichem Zustand erhalten bleiben. Die meisten Fixierungsmittel basieren auf einer eiweißfällenden Wirkung und die häufig verwendete Formaldehydfixierung hat zusätzlich den Vorteil, dass sie durch Eiweißvernetzung zu einer besonderen Strukturhaltung führt. Bei der Immersionsfixation wird das Gewebe in das Fixativ eingelegt und das Fixierungsmittel diffundiert in das Gewebe. Der Nachteil dieser Methode ist, dass das Gewebe nicht „lebensfrisch“ erhalten bleibt, wenn die Gewebeblöcke zu groß sind (Bucher and Wartenberg, 1997). Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Versuchstiere post mortem transkardial mit der Fixierungslösung perfundiert. Durch die Perfusion gelangt das Fixativ über die Blutgefäße und das Kapillarsystem auch tief in das Gewebe. Nach der Fixation in 4% Paraformaldehyd über

einen Zeitraum von mehreren Wochen wurden von dem Gewebeblock auf einem Vibratom Schnitte von 50 µm Dicke angefertigt.

Nissl Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine Methode, um Zellkörper im Gewebe anzufärben. Kresylviolett bindet an basophile Moleküle wie RNA, DNA und Stapel vom rauen endoplasmatischen Retikulum, die sogenannten Nissl-Schollen (Romeis, 1948). Das Ergebnis ist eine bläuliche Färbung der Nucleoli und Ribosomen, wodurch sich die Zellkörper deutlich von den Fasern der weißen Substanz abheben. Die durch den Stichkanal hervorgerufenen Läsionen lassen sich so durch Mikroskopieren der Nissl-Schnitte identifizieren.

Rekonstruktion

Alle den PMLS Kortex umfassenden Schnitte wurden unter Verwendung der Software Neurolucida am Computer rekonstruiert. In jedem der digitalisierten Schnitte wurde die Grenze von Schicht 1 in PMLS und der Übergang von PMLS zur weißen Substanz eingezeichnet. Des Weiteren wurden in jedem Schnitt die durch die Elektroden hervorgerufenen Läsionen eingezeichnet und markante Stellen wie Blutgefäße markiert. Anschließend wurden alle rekonstruierten Schnitte digital übereinander gelagert. Das Resultat ist eine dreidimensionale Rekonstruktion des PMLS Kortex inklusive der Stichkanäle. Anhand dieses Modells kann überprüft werden, ob sich alle Elektroden innerhalb der grauen Substanz von PMLS befanden.

Die dreidimensionale Rekonstruktion von PMLS inklusive des Stichkanals der von mir ausgewerteten PMLS-Elektrode Nr. 1 ist dem Ergebnisteil zu entnehmen. Für die Ergebnisse bezüglich aller Elektroden verweise ich auf die Bachelorarbeit von Frau Eva Hirsch hier am Fachbereich (Hirsch, 2012).

6 Ergebnisse

6.1 Ergebnisteil: Experimente Phase 1

Wie *Abbildung 19* zeigt, ist eine Visualisierung neuronaler Aktivität durch spannungsabhängige Farbstoffe möglich. Ein kolumnäres Signal auf einen Stimulus vertikaler Orientierung ist bereits 66 ms nach Beginn der Stimulation erkennbar. Die Aufnahmesequenz basiert auf dem arithmetischen Mittel von 8 Single Trials. Das Aufmitteln von 8 Trials ist ausreichend, um ein stabiles Signal über die Zeit mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. In *Abbildung 20* ist die neuronale Aktivität einer Kolumne über die Zeit aufgetragen. Für die Darstellung wurden die einzelnen Pixel innerhalb einer Kolumne gemittelt.

6.1.1 Visuell evozierte Aktivität in Area 18

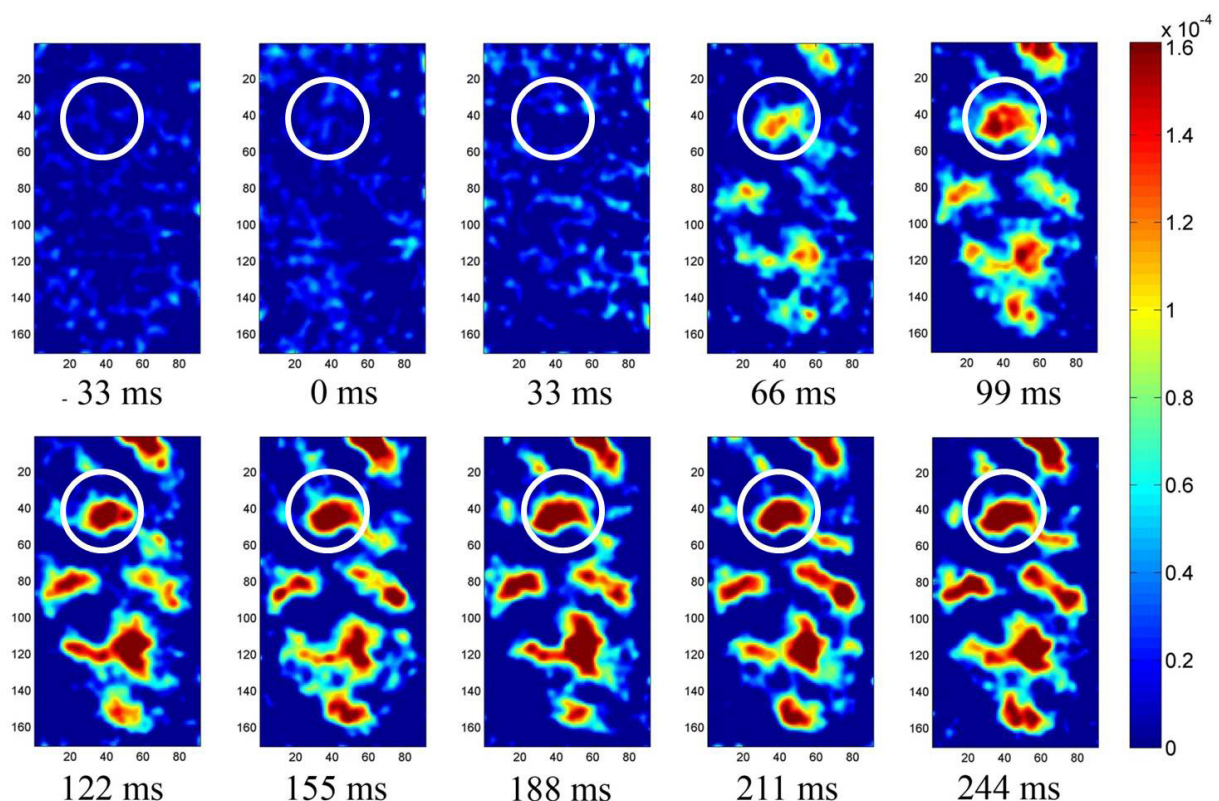


Abbildung 19: Visuell evozierte Aktivität in Area 18

Dargestellt ist die evozierte Aktivität in Area 18 hervorgerufen durch einen visuellen Stimulus. Dargeboten wurde ein bewegtes Grating mit der Orientierung 0° . Die Stimulation begann zum Zeitpunkt 0 Millisekunden und nach 66 Millisekunden ist ein kolumnäres Signal als Antwort auf den Stimulus zu erkennen.

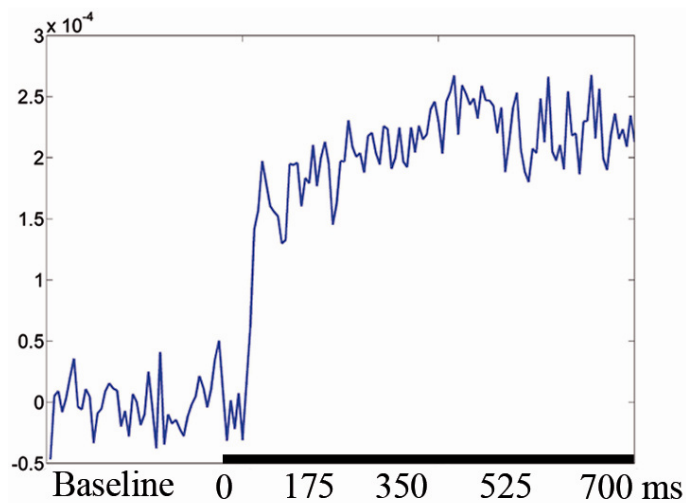


Abbildung 20: Graphische Darstellung der visuell evozierten Aktivität über die Zeit

Das Zeitdiagramm stellt die neuronale Aktivität, gemittelt über alle Pixel innerhalb einer Kolumne, während der Baseline und der Stimulationsphase dar. Die entsprechende Kolumne ist in Abbildung 19 markiert.

6.1.2 Validierung der optischen Karten

Wie zuvor dargestellt, ist es mit Hilfe des Voltage Sensitive Dye Imaging möglich, die neuronale Antwort auf einen Stimulus räumlich und zeitlich hoch aufgelöst zu visualisieren. Da die Methodik in unserem Labor zuvor noch nicht verwendet wurde, mussten die ermittelten topographischen Karten neuronaler Aktivität zunächst validiert werden, um den Befund zu sichern, dass das gemessene Signal neuronalen Ursprungs ist. Dafür wurde die visuell evozierte Aktivität in Area 18 der Katze mit der in unserem Labor bereits etablierten Methodik des Intrinsic Imaging (Galuske et al., 2002, Niessing et al., 2005) gemessen und mit den Karten resultierend aus dem Voltage Sensitive Dye Imaging verglichen. Wie *Abbildung 21* zeigt, korrelieren die Muster neuronaler Aktivität visualisiert durch Intrinsic- und Voltage Sensitive Dye Imaging.

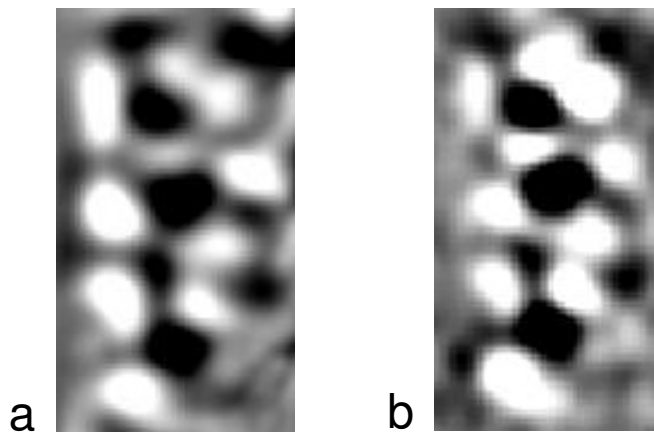


Abbildung 21: Vergleich der evozierten Karten visualisiert durch Intrinsic- und VSD Imaging

Dargestellt ist die kortikale Aktivität in Area 18 visualisiert durch a) Intrinsic Imaging und b) Voltage Sensitive Dye Imaging. Kolumnen die auf ein bewegtes horizontales Balkenmuster reagieren sind in weiß abgebildet, Kolumnen die auf ein bewegtes vertikales Balkenmuster reagieren erscheinen in schwarz. Um die Karten vergleichen zu können, wurden die Farben der Pixel in der Intrinsic Imaging Karte invertiert. Neuronale Aktivitäten werden beim Intrinsic Imaging durch dunkle Pixel reflektiert (Absorptionssignal), beim Voltage Sensitive Dye Imaging hingegen durch helle Pixel (Fluoreszenzsignal).

6.1.3 Das ICA Modell

Der modellierte Datensatz sollte eine reale Aufnahmesituation in einem *in vivo* Experiment darstellen. Der Datensatz war daher eine Kombination aus drei verschiedenen Komponenten über die Zeit, einem neuronalen Signal, welches durch die Artefakte von Herzschlag und Shot Noise verunreinigt wurde. Der Datensatz entsprach einem Trial mit einer Dauer von 1 s und unterteilte sich in 500 ms Baseline und 500 ms Stimulation. Das Herzschlagartefakt wurde durch ein phasisches Erhellern und Verdunkeln des gesamten Frames, was das rhythmische Pulsieren des Kortex widerspiegeln soll, simuliert (Abbildung 23a und Abbildung 24a). *In vivo* verändert sich durch das Pulsieren des Gehirns der Abstand zwischen Kamera und Kortexoberfläche und dementsprechend verändert sich das Lichtverhältnis in Abhängigkeit von der Herzschlagphase. Zusätzlich enthielt das simulierte Herzschlagartefakt ein Blutgefäß, welches phasisch heller und dunkler wurde, entsprechend einer realen Situation, in der es entweder von oxygeniertem oder desoxygeniertem Blut durchströmt wird (Abbildung 24). Das simulierte neuronale Signal ist ein kolumnäres Muster, welches während der Stimulationsphase erscheint (Abbildung 22). Das kolumnäre Signal wurde in seiner Amplitude vom Herzschlagartefakt beeinflusst. Als letzte Komponente wurde eine Simulation von Shot Noise in das Modell gebracht, in dem ein zufälliges Rauschen von Pixeln über alle Frames gelegt wurde (Abbildung 22). Überprüft wurde nun, ob mit Hilfe der Independent Component Analyse das verunreinigte Signal in seine ursprünglichen

Komponenten separiert werden konnte. Das Ziel der Methode war die Separation von Herzschlag und neuronaler Komponente.

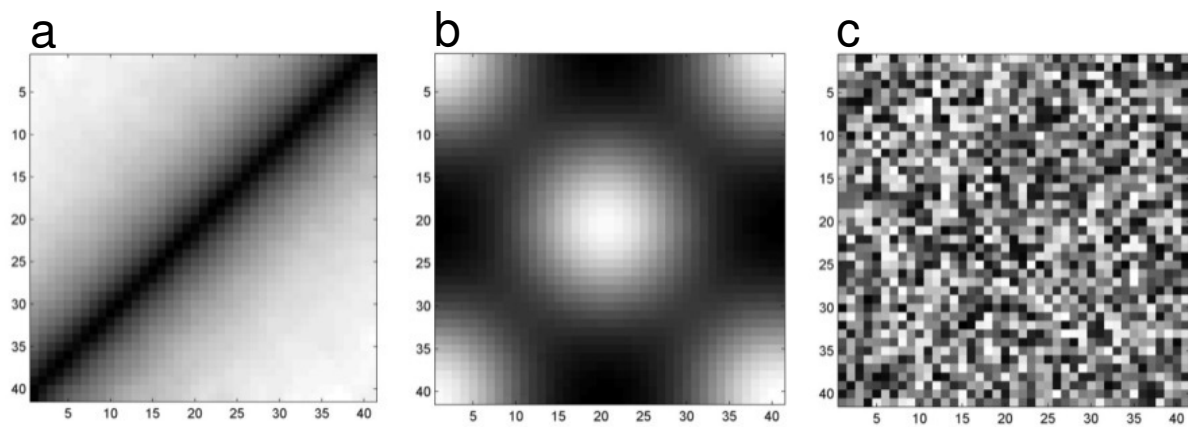


Abbildung 22: Das ICA Modell

Dargestellt sind die 3 Komponenten des modellierten Datensatzes. Das Blutgefäß und der Bildhintergrund (a) verändert seine Helligkeit in Abhängigkeit vom Herzrhythmus. Das kolumnäre Signal (b) erscheint nach einem Zeitraum von 500 ms. Abbildung (c) reflektiert den shot noise. Alle drei Komponenten wurden linear miteinander verrechnet. Der zeitliche Verlauf des Herzschlagartefakts, des kolumnären Signals und des verunreinigten Signals ist in Abbildung 23 dargestellt.

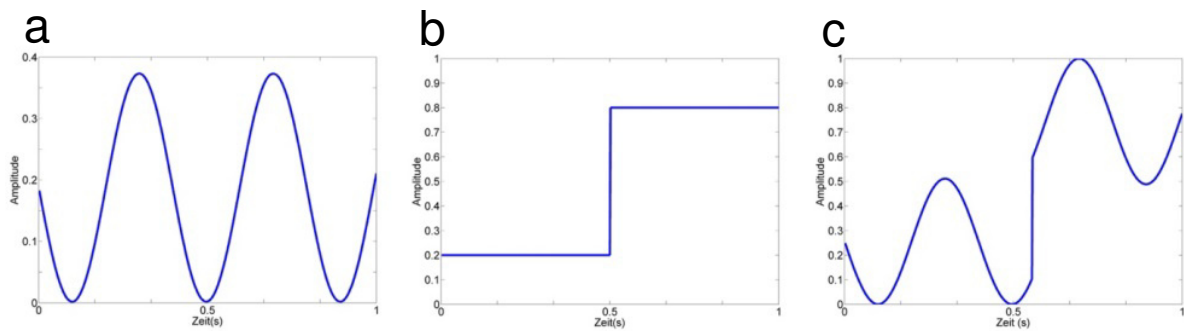


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Modelldaten

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf Herzschlagartefakts (a), der zeitlicher Verlauf des neuronalen Signals (b) und der zeitliche Verlauf nach dem linearen Mix der beiden Signale (c).

Frames aus modelliertem Datensatz:

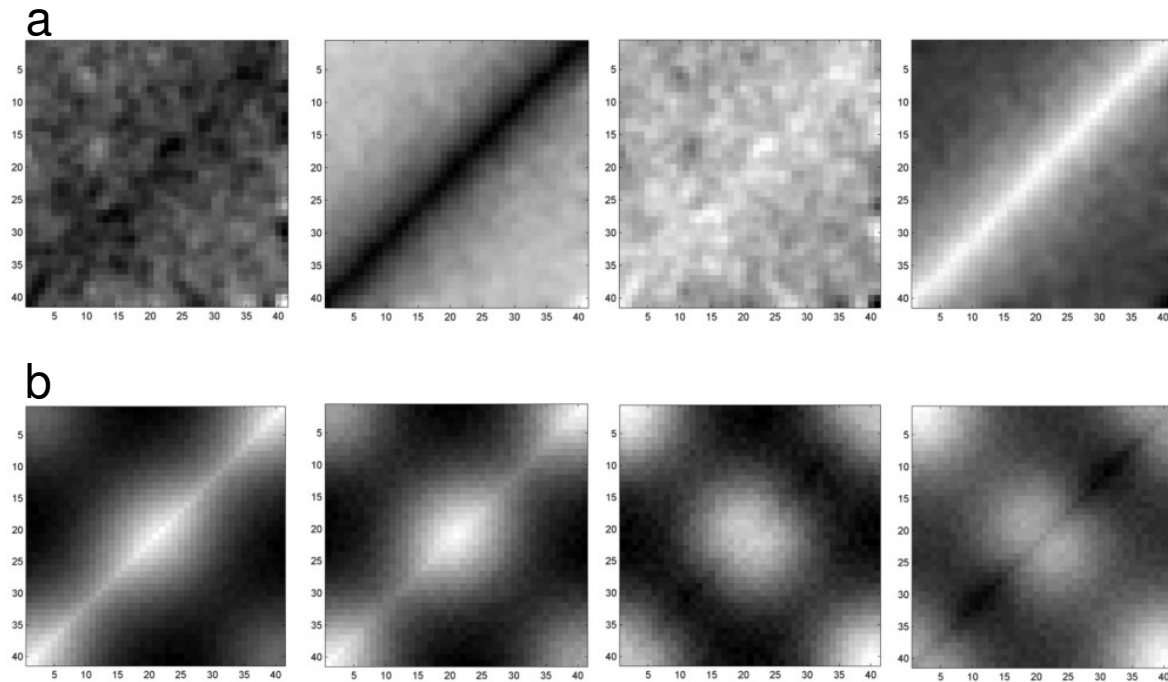


Abbildung 24: Die Visualisierung des modellierten Datensatzes

Dargestellt sind einzelne Frames aus dem modelliertem Datensatz nach dem linearen Mix von Herzschlagartefakt, kolumnären Signal und shot noise. a) Während der Baseline werden das Blutgefäß und der Kortex im Rhythmus des Herzschlags heller und dunkler. b) Das Störsignal von Herzschlag und Blutgefäß verunreinigt das kolumnäre Signal. Mit Hilfe der ICA sollten das Herzschlagartefakt und das kolumnäre Signal separiert werden. Das Ergebnis der Separierung wird in Abbildung 26 gezeigt.

Anwendung der Independent Component Analyse auf modellierte Daten

Wie schon erwähnt, sind die optischen Daten durch biologische Artefakte aus dem Herzschlag der Katze verunreinigt. Um die Daten von diesem Artefakt zu bereinigen, wurde die Independent Component Analyse verwendet. Um zu verifizieren, dass die ICA prinzipiell dazu in der Lage ist, das Herzschlagartefakt zu isolieren, wurde der Algorithmus zunächst an einem modelliertem Datensatz getestet. Die Komposition des Modelldatensatzes wurde zuvor beschrieben. Wie in *Abbildung 26* zu erkennen, ist der Algorithmus dazu in der Lage, aus dem kontaminierten Datensatz die neuronale Aktivität und das Herzschlagartefakt zu isolieren.

Eingabedaten:

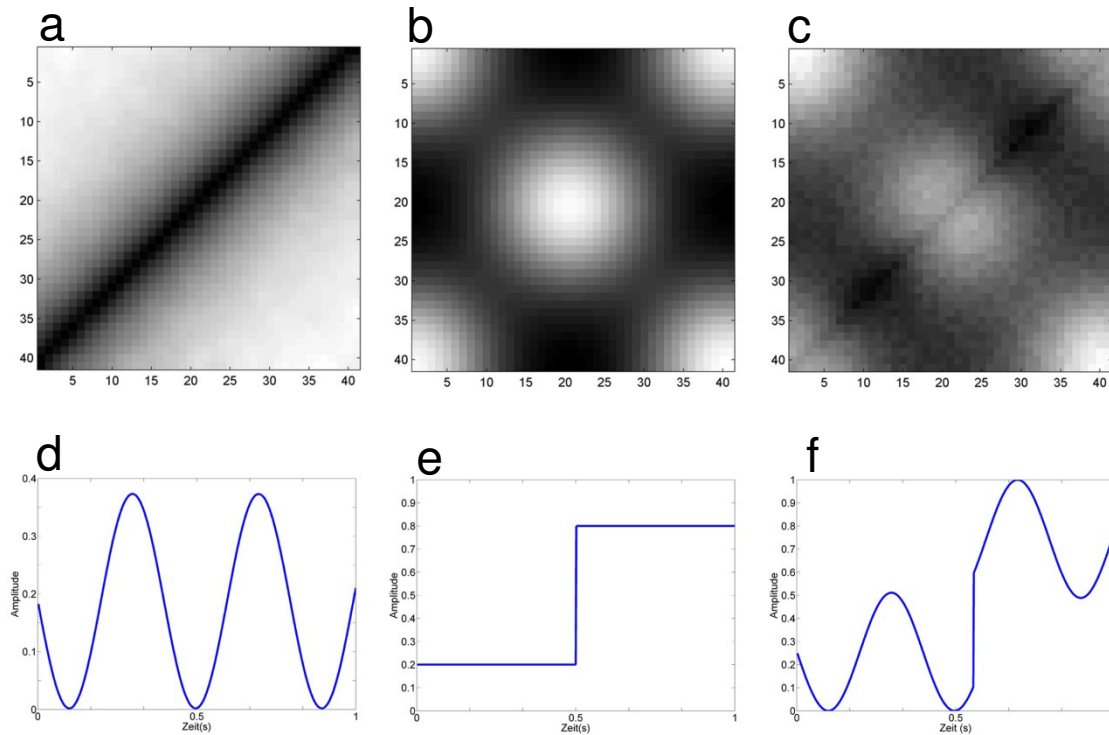


Abbildung 25: Der modellierte Datensatz - Eingabedaten

a) Dargestellt ist das Herzschlagartefakt innerhalb des modellierten Datensatzes. Das Blutgefäß und der Bildhintergrund verändert seine Helligkeit im Herzrhythmus. Die Amplitude des Herzschlagartefakts über die Zeit ist in d) dargestellt.

b) Das neuronale Signal setzt nach 0.5 Sekunden ein. Der Zeitverlauf des kolumnären Signals ist in e) dargestellt.

c) Dargestellt ist die Kombination aus Herzschlagartefakt, kolumnären Signal und Shot Noise. Der Zeitverlauf des mit Störsignalen kontaminierten Signals ist in f) abgebildet.

Separierung der einzelnen Komponenten mit Hilfe der ICA:

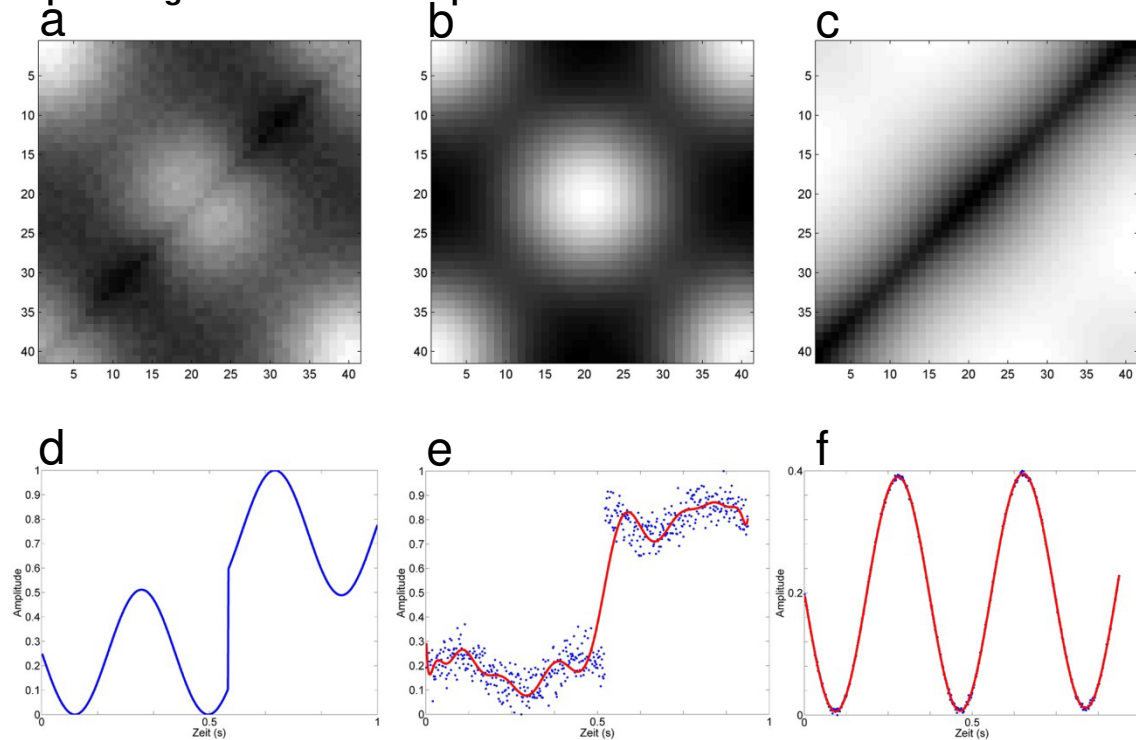


Abbildung 26: Entfernung von Artefakten durch die ICA

a) und d) zeigen den mit Störsignalen kontaminierten Datensatz. Nach Anwendung der Independent Component Analyse konnten jeweils das kolumnäre Signal (b) und das Herzschlagartefakt (c) isoliert werden. Die Zeitverläufe der separierten Signale b) und c) sind in e) und f) dargestellt.

6.1.4 Anwendung der ICA auf physiologische Daten

Nach erfolgreichem Einsatz der ICA im Modell wurde der Algorithmus eingesetzt, um das Herzschlagartefakt aus einem realen neuronalen Datensatz zu isolieren. Wie in *Abbildung 27* dargestellt, hat die ICA den physiologischen Datensatz in 9 Hauptkomponenten separiert. Komponente 1 erweckt den Anschein, den Herzschlag der Katze zu reflektieren. Um das Herzschlagartefakt zu identifizieren, wurden alle Komponenten einer Fourier-Transformation unterzogen, um die Power im Frequenzbereich zwischen 2-3 Hz zu ermitteln (*Abbildung 28*). Die Frequenz von 2-3 Hz entspricht einer Herzfrequenz von 120-180 Schlägen pro Minute, innerhalb welcher sich die Herzfrequenz der Katze in vivo bewegt. Wie *Abbildung 28* exemplarisch zeigt, ist die Power der Komponente 1 in etwa 4-mal höher als die Power aller restlichen Komponenten und wurde daher als Herzschlagartefakt klassifiziert. Um einen bereinigten Datensatz zu erzeugen, wurden alle Komponenten bis auf die des Herzschlags wieder zusammengesetzt.

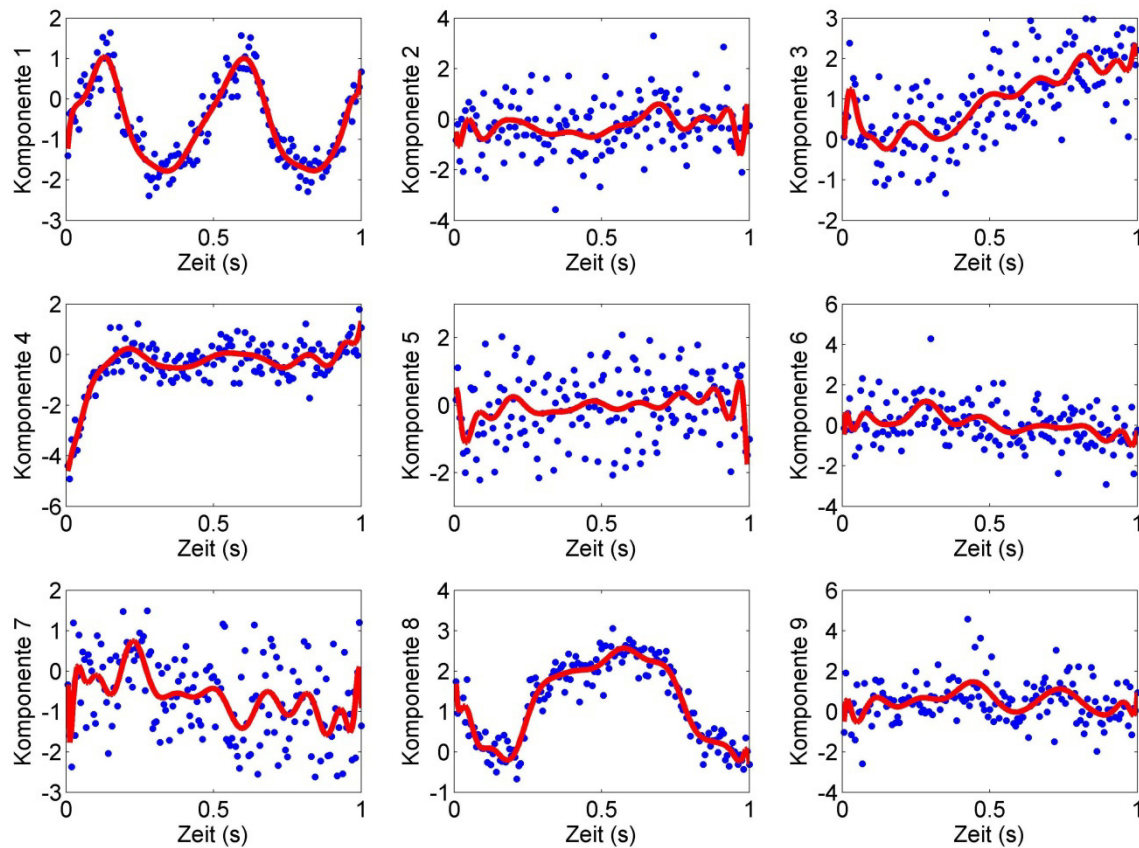


Abbildung 27: Anwendung der ICA auf physiologische Daten

Die optischen Daten wurden mit Hilfe der ICA in ihre 9 Hauptkomponenten zerlegt, dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Komponenten einer einzelnen Aufnahmesequenz. Komponente 1 ähnelt in ihrem zeitlichen Verlauf dem Herzrhythmus der Katze. Um zu verifizieren, welche Komponente das Herzschlagartefakt ist, wurde mit Hilfe der Fourier-Transformation die Power aller Komponenten im Frequenzbereich zwischen 2 und 3 Hz ermittelt.

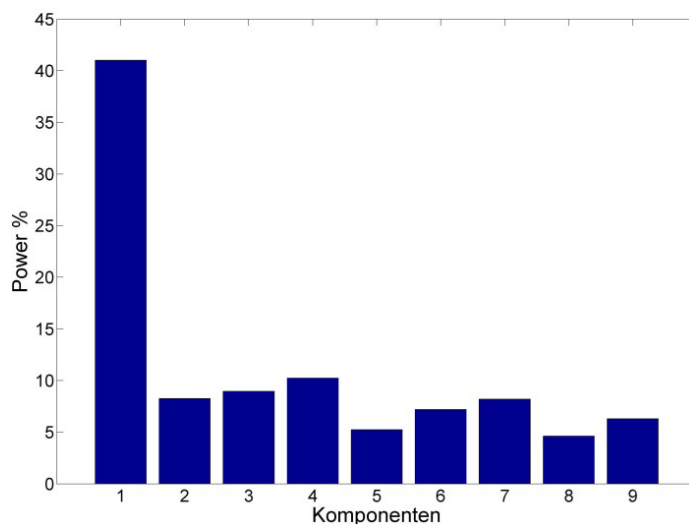


Abbildung 28: Power der isolierten Komponenten im Frequenzbereich 2-3 Hz

Dargestellt ist die Power im Frequenzbereich zwischen 2 und 3 Hz aller 9 Komponenten aus Abbildung 27. Die Power der Komponente 1 übersteigt die Power aller anderen Komponenten um das vierfache und wurde daher als Herzschlagartefakt identifiziert. Um einen bereinigten Datensatz zu erzeugen, wurden alle Komponenten bis auf die des Herzschlags wieder zusammengesetzt.

Vergleich von unbehandelten und bereinigten Daten

Um zu überprüfen, ob sich durch die Beseitigung des Herzschlagartefakts die Datenqualität verbessert hatte, wurden bereinigte und nicht bereinigte Aufnahmesequenzen auf Single Trial Niveau miteinander verglichen (*Abbildung 29*). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, ist die Amplitude des bereinigten Datensatzes räumlich über die Zeit stabiler und weist eine höhere Ähnlichkeit zur hoch gemittelten optimalen Karte auf. Um diesen Befund zu verifizieren, wurden Artefakt freie und Artefakt behaftete optischen Karten auf Single Trial Niveau berechnet und mit den optimalen Karten korreliert.

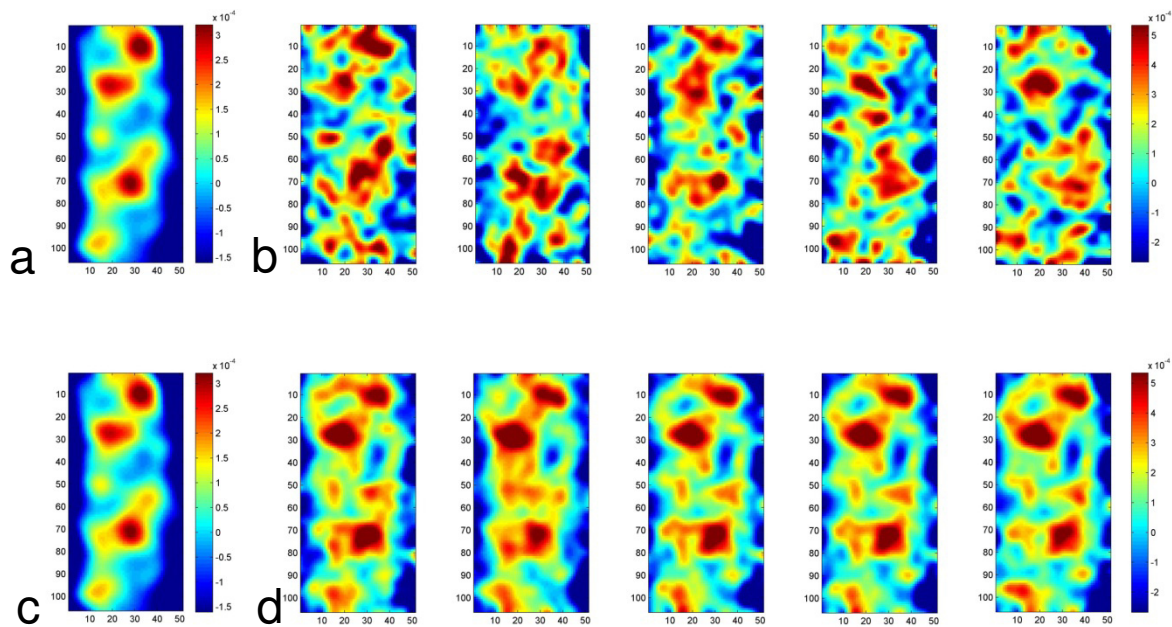


Abbildung 29: Vergleich der Karten vor- und nach Beseitigung des Herzschlagartefaktes

Abbildung a) und c) zeigen die hochgemittelte optimale Karte hervorgerufen durch einen Stimulus (Grating 90°). In d) ist die evozierte Aktivität innerhalb einzelner Frames eines Single Trials nach Entfernung des Herzschlagartefakts mit Hilfe der ICA visualisiert. Abbildung b) zeigt die gleichen Frames innerhalb des unbereinigten Datensatzes.

Korrelation von Single Trial Maps mit hoch gemittelten Karten

Insgesamt 458 Single Trials aus 2 Experimenten wurden mit Hilfe der ICA vom Herzschlagartefakt befreit. Artefakt freie und Artefakt behaftete optischen Karten auf Single Trial Niveau wurden mit hochgemittelten Karten korreliert. Wie *Abbildung 30* zeigt, ist der Korrelationskoeffizient der ICA bereinigten Trials mit den optimalen Karten im Mittel höher als 0.65. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, dass die bereinigten Daten eine deutliche höhere Korrelation zu den optimalen Karten aufweisen, als die Unbereinigten. Der Korrelationskoeffizient ist im Mittel um mindestens 24 % erhöht und der Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0.001$).

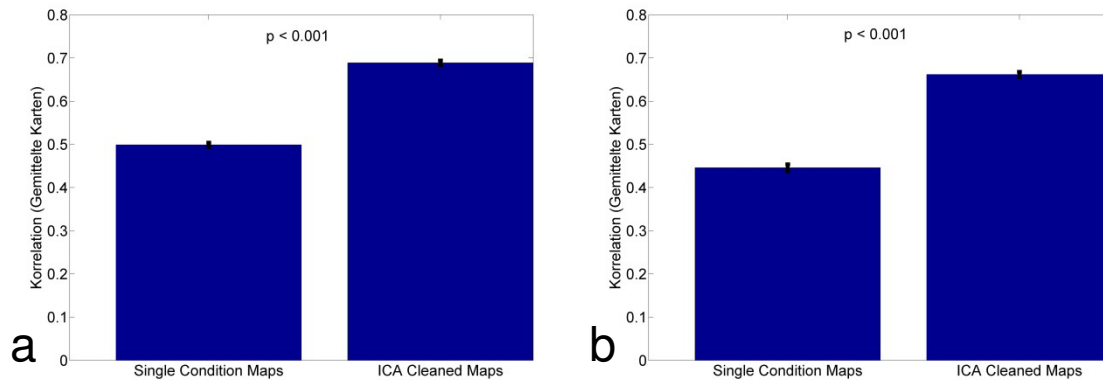


Abbildung 30: Vergleich der unbereinigten und mittels ICA bereinigten Datensätze

Dargestellt ist die Korrelation aller Single Trial Maps resultierend aus den unbereinigten und mittels ICA bereinigten Datensätze mit der optimalen Karte der Experimente 140709 (a) und 121409 (b). (Fehlerbalken=SEM). In beiden Experimenten weisen die bereinigten Daten eine höhere Korrelation zu den optimalen Karten auf, als die unbereinigten Daten. Die Unterschiede sind signifikant (Mann-Whitney-U Test).

Single Trial Variabilität trotz ICA

Wie Abbildung 31 zeigt, ist auch nach der Optimierung der Datenqualität eine hohe Variabilität in den optischen Karten zu erkennen, obwohl dem Versuchstier der gleiche Stimulus dargeboten wurde.

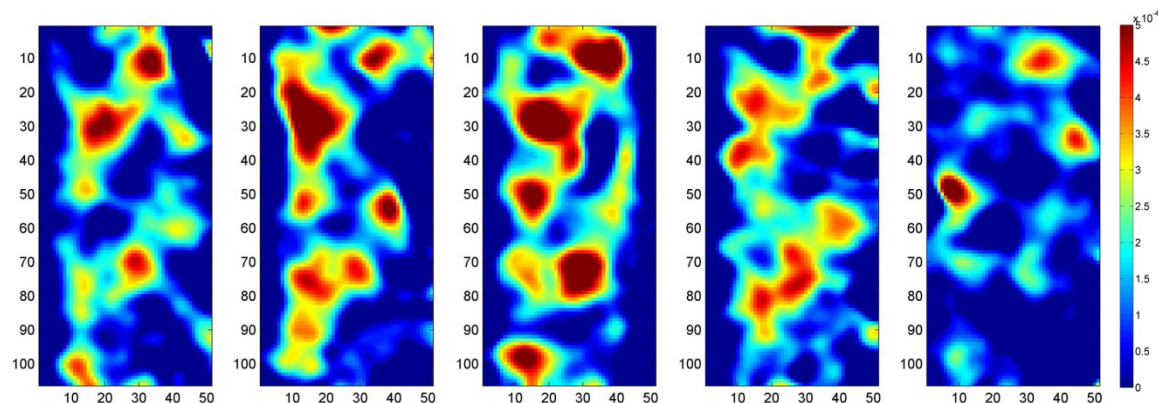


Abbildung 31: Variabilitäten innerhalb der evozierten Karten

Die Abbildung zeigt Single Trial Maps resultierend aus Datensätzen, von welchen zuvor mit Hilfe der ICA das Herzschlagartefakt beseitigt wurde. Das Versuchstier wurde innerhalb jedes Trials visuell mit einem bewegten Grating (90°) stimuliert. Die durch den Stimulus hervorgerufene evozierte Aktivität unterscheidet sich von Trial-to-Trial trotz konstanter Versuchsbedingungen und Beseitigung des Herzschlagartefakts voneinander.

Um technische Störsignale als Ursache für die Variabilität ausschließen zu können, wurde das Aufnahmesystem modernisiert. Durch die Integration einer neuen Kamera mit einer höheren *well depth* und einer höheren *QE* in das Aufnahmesystem, konnte der das Imaging

hauptsächlich limitierende *Shot Noise* minimiert werden, woraus eine höhere *Signal-to-Noise-Ratio* bezogen auf die Daten resultierte. Durch die Synchronisation von Atempumpe und EKG mit der Aufnahmeeinheit konnte das Artefakt aus der Beatmung des Tieres und das Herzschlagartefakt beseitigt werden. Mit Hilfe des modernisierten Aufnahmesystems sollte anschließend der Frage nachgegangen werden, ob auch in den neu generierten Daten Variabilitäten beobachtet werden können und ob diese neuronalen Ursprungs sind.

6.2 Ergebnisteil: Experimente Phase 2

6.2.1 Single Trial Variabilität trotz bester technischer Voraussetzungen

Wie zuvor beschrieben, wurde ein neues Kamerasystem in das Setup integriert und das EKG und die Atempumpe mit der Datenaquisition synchronisiert. Die Daten enthalten somit keine Artefakte resultierend aus dem Herzschlag oder der Atmung. Trotz bester technischer Voraussetzungen ist eine hohe Variabilität in den optischen Daten zu erkennen (*Abbildung 32*). Die Karten reflektieren die neuronale Antwort auf ein Kinematogramm bewegter Punktmuster gleicher Richtung. Da die technischen und biologischen Störquellen maximal minimiert wurden, konnte nun sicher überprüft werden, ob die Variabilitäten auf Fluktuationen innerhalb der neuronalen Spontanaktivität zurückzuführen sind.

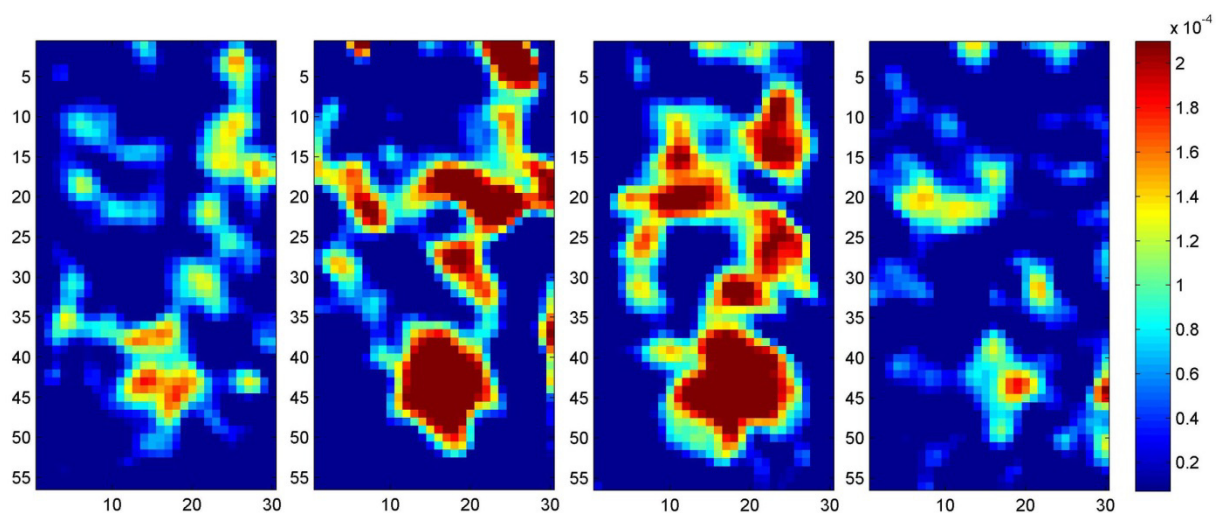


Abbildung 32: Variabilitäten innerhalb der evozierten Karten

Dargestellt ist die evozierte kortikale Aktivität in Form von Single Trial Maps hervorgerufen durch ein Kinematogramm bewegter Punktmuster (90°). Die Aufnahmen stammen von dem technisch optimierten Aufnahmesystem und das Herzschlagartefakt wurde durch Subtraktion des Blank-Trials beseitigt. Die durch den Stimulus hervorgerufene evozierte Aktivität unterscheidet sich von Trial-to-Trial trotz konstanter Versuchsbedingungen.

6.2.2 Analyse der Spontanaktivität

6.2.2.1 Kohonen Algorithmus

Die Analyse der Spontanaktivität erfolgte unter Einsatz des Kohonen-Algorithmus. Mit Hilfe dieses Clusteralgorithmus wurde der Frage weiter nachgegangen, ob einerseits Cluster von hoher oder niedriger Amplitude innerhalb der Spontanaktivität existieren, und ob Cluster sich räumlich ähnelnder Zustände identifizierbar sind. Um zu überprüfen, ob der Algorithmus grundsätzlich Cluster innerhalb der neuronalen Aktivität finden kann, wurde er zunächst auf einen hochgemittelten Datensatz mit Stimulus evozierter Aktivität angewendet. Dieser Datensatz setzt sich aus einer Aneinanderreihung von acht Aufnahmesequenzen unterschiedlicher Stimulusrichtung zusammen. Wie in Abbildung 33a dargestellt, ist der Algorithmus dazu in der Lage, die Baseline von der evozierten Aktivität zu separieren. Des Weiteren konnte der Algorithmus die unterschiedlichen Stimulationsbedingungen voneinander trennen, jeder Bedingung ist ein eigenes Cluster zugeordnet.

Anschließend wurde überprüft, ob der Algorithmus die evozierte Aktivität einer einzelnen gemittelten Stimulusbedingung von der Baseline-Aktivität trennen kann. Wie in Abbildung 33b dargestellt, findet der Algorithmus 2 unterschiedliche Cluster (Baseline und Stimulation).

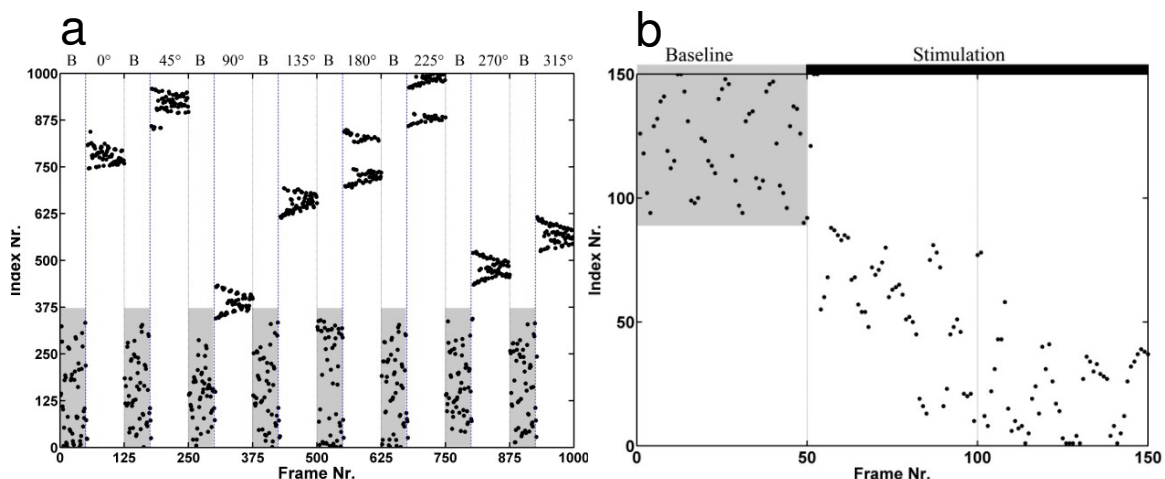


Abbildung 33: Das Auffinden von Clustern mit dem Kohonen Algorithmus

a) Das Clustervermögen des Kohonen Algorithmus wurde anhand eines Datensatzes getestet, der aus 1000 Frames besteht. Der Datensatz ist aus einer Aneinanderreihung von jeweils 50 Baseline-Frames und 75 Frames aus der Stimulationsphase ($0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, \dots$) aufgebaut. Der Algorithmus hat für die Frames aus der Baseline oder der Stimulationsphase unterschiedliche Cluster ermittelt. b) Der Datensatz wurde auf 125 Frames verkleinert (50 Frames Baseline, 75 Frames Stimulationsphase). Der Algorithmus ist dazu fähig, die Frames aus der Baseline und die Frames aus der Stimulationsphase in Form von 2 Clustern voneinander zu trennen.

Um die Clustereigenschaften weitergehend zu untersuchen, wurden einzelne Frames des aufgemittelten Trials während der Stimulationsphase in die Baseline permutiert, um zu überprüfen, ob der Algorithmus auch diese Frames von den Baseline-Frames zu trennen vermag. Diese Eigenschaft ist für die Analyse der Spontanaktivität wichtig, da der Algorithmus dazu in der Lage sein muss spontan auftretende Muster hoher Aktivität von der neuronalen Grundaktivität zu trennen. Die *Abbildung 34* zeigt die deutliche Trennung von Frames aus der Baseline und der Stimulationsphase.

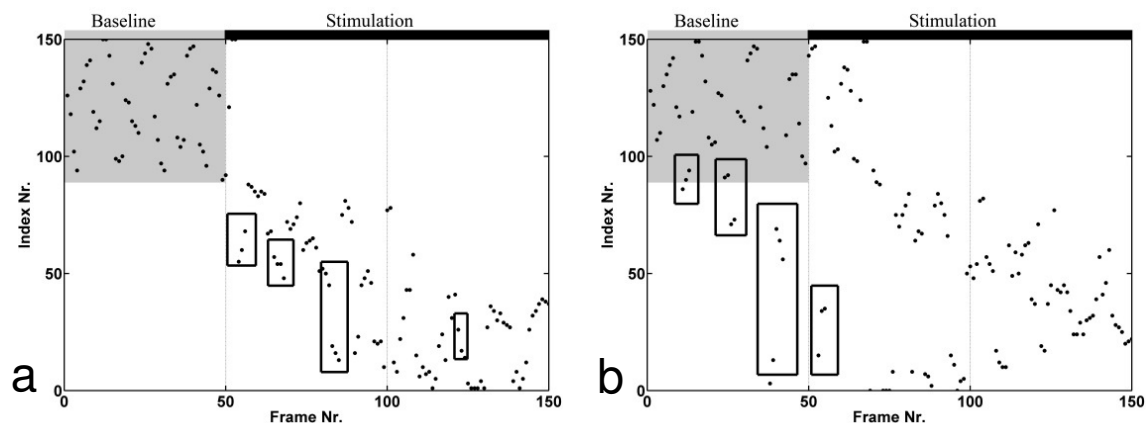


Abbildung 34: Das Clustern einzelner Frames

a) Einzelne Frames aus der Stimulationsphase wurden randomisiert unter die Frames der Baseline gemischt und anschließend wurde der Datensatz durch den Algorithmus analysiert. Die entsprechenden Frames sind in der Abbildung schwarz umrandet. Der Algorithmus kann die einzelnen permutierten Frames von der Baseline trennen (b). Der Algorithmus ist somit in der Lage, nicht nur die gesamte Baseline von der Stimulationsphase zu trennen, sondern auch gezielt einzelne Frames auszusortieren.

Durch das Aufmitteln von Trials erhöht sich das Verhältnis von Signal zu Rauschen. Um allerdings spontane Zustände analysieren zu können, ist es erforderlich, auf *Single Trial* Niveau zu arbeiten. Daher wurde verifiziert, ob der Algorithmus evozierte Aktivität in einem *Single Trial* von der spontanen Aktivität innerhalb der Baseline zu trennen vermag. Die *Abbildung 35* zeigt diesen Zusammenhang.

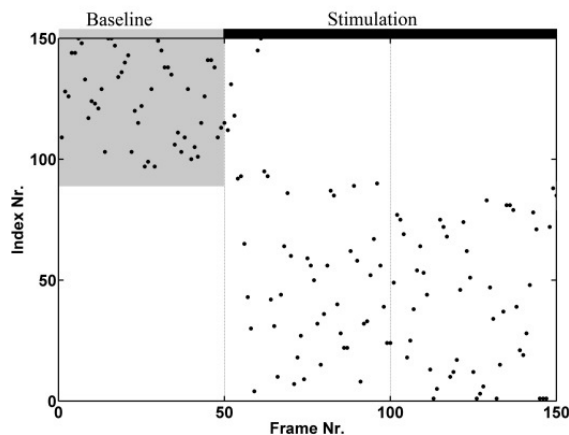


Abbildung 35: Das Clustern auf Single Trial Niveau

Der Kohonenalgorithmus kann auch innerhalb einer einzelnen Aufnahmesequenz die Stimulationsphase von der Baseline sicher isolieren. Die Baseline innerhalb einer einzelnen Aufnahmesequenz reflektiert die Spontanaktivität der kortikalen Neurone, da weder mehrere Trials gemittelt, noch ein visueller Stimulus dargeboten wurde.

Tsodyks und Arieli haben gezeigt, dass es räumliche Muster innerhalb der Spontanaktivität gibt, die der evozierter Aktivität ähneln (Tsodyks et al., 1999). Um zu überprüfen, ob der Kohonen Algorithmus zu dieser Beobachtung fähig ist, wurden einzelne evozierte Frames unter die Frames der Baseline eines Single Trials gemischt. Wie in *Abbildung 36* dargestellt, kann der Algorithmus die in die Baseline permutierten Frames identifizieren.

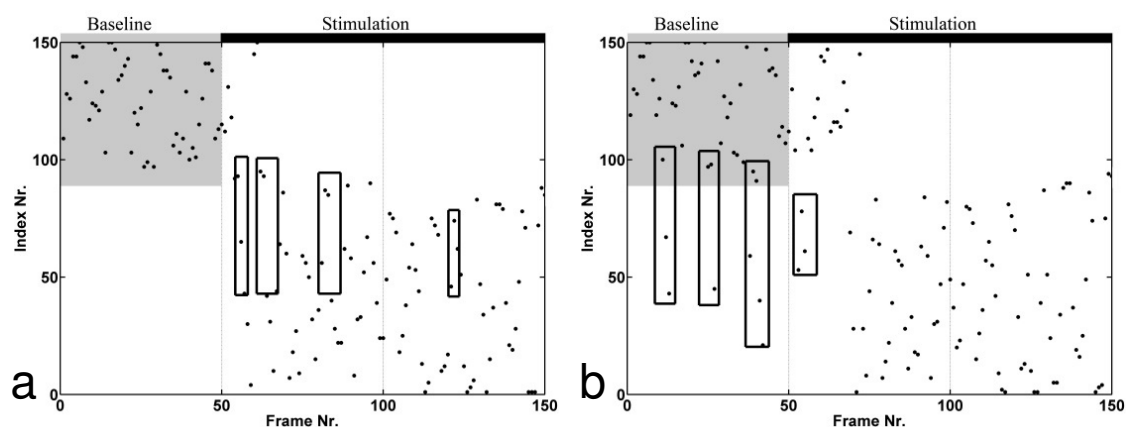


Abbildung 36: Das Clustern einzelner Frames auf Single Trial Niveau

Einzelne Frames aus der Stimulationsphase eines Singletrials wurden in die Baseline (Spontanaktivität) permutiert (a) und vom Algorithmus identifiziert (b). Die entsprechenden Frames sind in der Abbildung schwarz umrandet. Der Algorithmus besitzt somit das Potential, einzelne Frames mit kolumnärer Aktivität oder hoher Amplitude innerhalb der Spontanaktivität zu identifizieren.

Da der Algorithmus auch auf Single Trial Niveau gute Ergebnisse lieferte, konnten so räumliche Muster innerhalb der Spontanaktivität identifiziert werden. Mit Hilfe dieses Algorithmus wurden über 50.000 Frames analysiert. Aufgrund der Indexierung werden ähnliche Frames entweder demselben Index oder einem Nachbarindex zugeordnet. Sich räumlich ähnelnde Muster über mehrere Frames innerhalb der Spontanaktivität lassen sich anhand von Indexclustern identifizieren. In einer vorangegangenen VSDI-Studie ist bereits gezeigt worden, dass Muster innerhalb der Spontanaktivität ihre räumliche Gestalt nicht innerhalb weniger Millisekunden verändern, sondern dass sie über einen Zeitraum von 100-200 ms stabil auftreten (Kenet et al., 2003). Der Vorteil durch die Anwendung des Kohonen Algorithmus liegt darin, dass man nicht 50.000 einzelne Frames mit hohem Rauschfaktor nach Auftreten von Mustern durchsuchen muss, sondern dass man gezielt einzelne *Cluster* untersuchen kann. Durch diese Methodik wird zum einen die Dimensionalität des Datensatzes deutlich reduziert, zum anderen wird die Signalqualität erhöht. Durch das Auffinden von *Clustern* ergibt sich die Möglichkeit, sich ähnelnde Frames (1 *Cluster*) zu mitteln, wodurch das Signal-Rauschen-Verhältnis um ein Vielfaches verbessert wird.

Ein *Cluster* innerhalb der Spontanaktivität kann durch das aus dem Algorithmus stammende *Modell* visualisiert werden. Das Modell beschreibt die räumliche Verteilung der Spontanaktivität innerhalb eines *Clusters*. Nachfolgend wird beispielhaft ein gefundenes *Cluster* dargestellt. Das *Cluster* umfasst 32 Frames identischer oder benachbarter Indexnummern und erstreckt sich somit über einen Zeitraum von 210 ms. *Abbildung 37* zeigt exemplarisch 6 ausgewählte Frames aus diesem *Cluster*. Zusätzlich sind die aus dem Aufmitteln aller 32 Frames resultierende Karte und das vom Algorithmus vorgeschlagene Modell über die räumliche Verteilung der Spontanaktivität innerhalb des *Clusters* dargestellt.

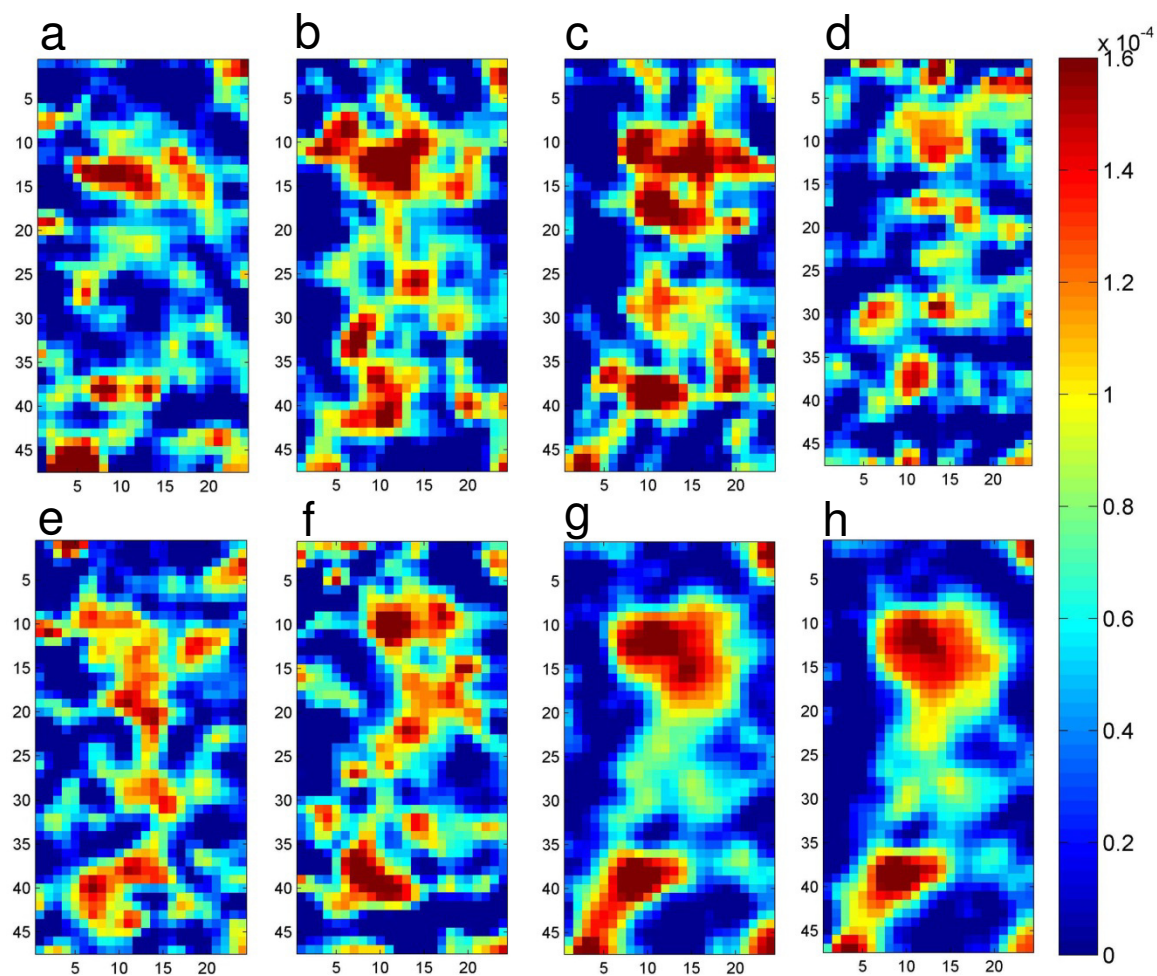


Abbildung 37: Ähnlichkeit von Frames im selben Cluster

Die Frames a-f stammen aus einem mit Hilfe des Kohonenalgorithmus identifizierten Clusters sich räumlich ähnelnder Aktivität innerhalb der Spontanaktivität. Abbildung (g) reflektiert die kortikale Aktivität gemittelt über alle Frames des Clusters. Abbildung (h) zeigt das vorgeschlagene Modell des Algorithmus, welches visualisiert, wie die Aktivität innerhalb des Clusters räumlich verteilt ist.

6.2.2.2 Raum-Zeitliche Muster in der Spontanaktivität

Die Analyse hat ergeben, dass innerhalb der Spontanaktivität eine hohe Anzahl an unterschiedlichen Mustern existiert. Durch den Vergleich mit optimalen Karten konnte gezeigt werden, dass vereinzelt spontane Zustände auftreten, die in ihrem Muster den Mustern von Stimulus evozierter Aktivität ähneln (*Abbildung 38*). Im letzten Fall, wurden die Versuchstiere mit Kinematogrammen bewegter Punktmuster stimuliert.

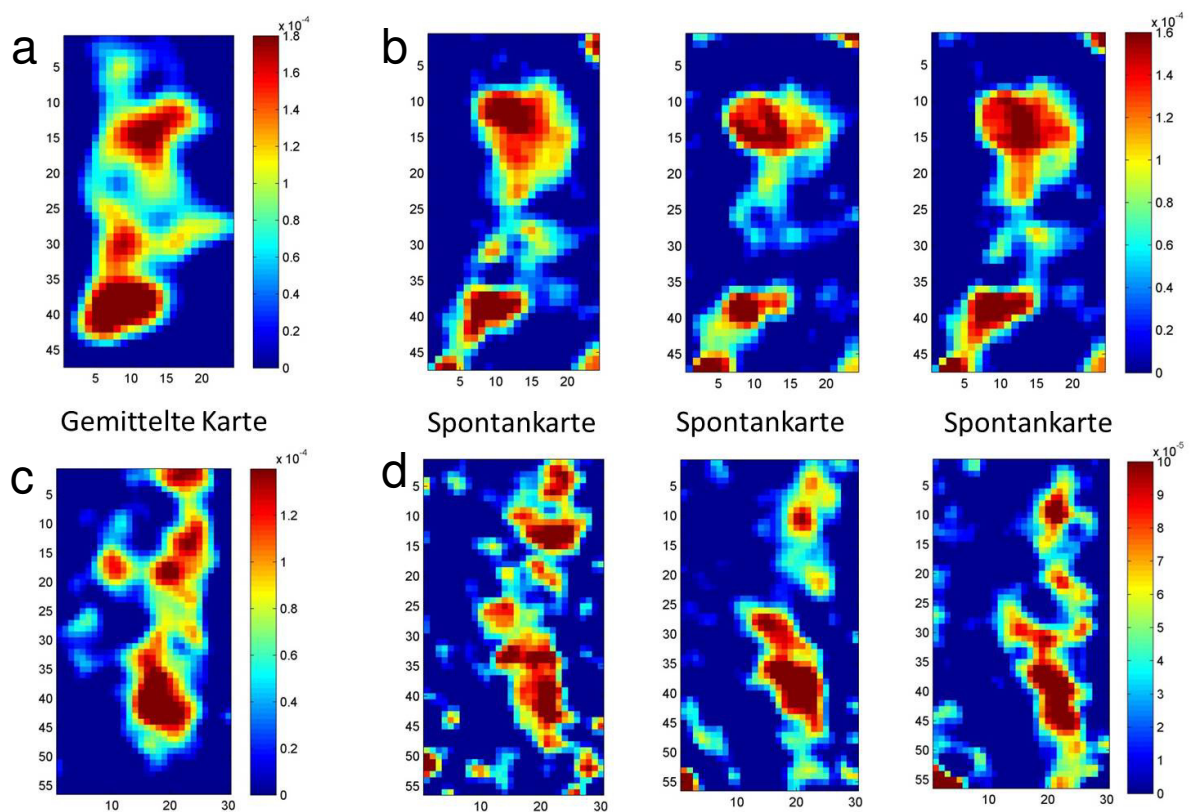


Abbildung 38: Ähnlichkeit von evozierter- und Spontanaktivität

Mit Hilfe des Kohonen-Algorithmus wurden Muster innerhalb der Spontanaktivität gefunden (b+d), die räumlich dem Muster evozierter Aktivität (a+c) hervorgerufen durch einen Stimulus ähneln. Die Abbildungen a) und b) stammen aus Experiment 112511, die Frames c) und d) aus Experiment 030512.

6.2.2.3 Phasen hoher und geringer Spontanaktivität

Während der Clusteranalyse ist aufgefallen, dass neben den verschiedenen spontan auftretenden Mustern der Datensatz vor allem von Phasen hoher und Phasen geringer Spontanaktivität dominiert wird (*Abbildung 39*). Der Einfluss dieser Schwankungen innerhalb der Spontanaktivität auf die Perzeption war für mich und meine Arbeit von besonderem Interesse. Daher befasst sich der nachfolgende Ergebnisteil nicht mit der Analyse von Mustern, sondern mit der Analyse der spontanen Amplitudenschwankungen innerhalb der Spontanaktivität.

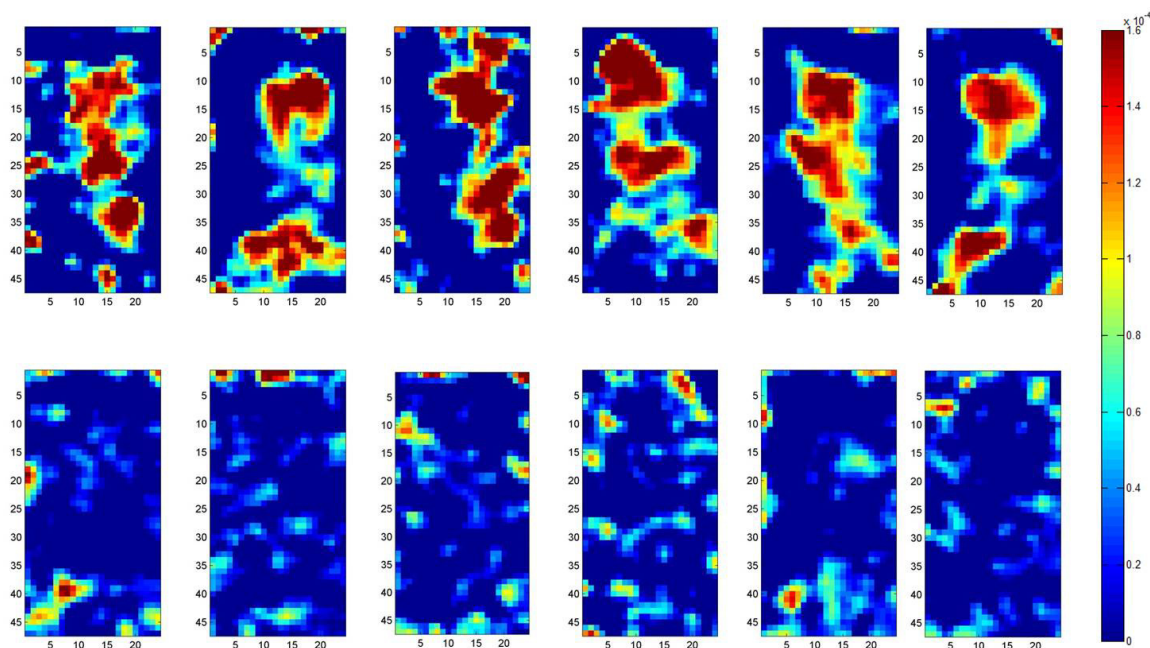


Abbildung 39: Aktivitätsunterschiede innerhalb der Spontanaktivität

Innerhalb der Spontanaktivität gibt es Phasen hoher (Abbildungen oben) und Phasen geringer spontaner neuronaler Aktivität (Abbildungen unten).

6.2.3 Analyse der Trial-to-Trial Variabilität

Mich beschäftigte in meiner Arbeit die Frage, worauf die hohe Trial-to-Trial Variabilität innerhalb der evozierten Karten zurückzuführen ist. Um zu klären, ob die Trial-to-Trial Variabilität über Schwankungen innerhalb der Amplitude der Spontanaktivität zu erklären sind, wurde der Datensatz in zwei Testgruppen aufgeteilt. Die eine Testgruppe beinhaltet alle Daten (Trials) mit hoher Spontanaktivität, die andere Testgruppe beinhaltet die Daten mit geringer Spontanaktivität.

Analysiert wurde die neuronale Aktivität in den 500 ms vor Stimulationsbeginn. Die globale spontane Populationsaktivität über alle Pixel wurde für jeden Trial errechnet. Trials mit hoher

Spontanaktivität, also Trials deren Populationsaktivität größer ist, als das 65% Perzentil der Populationsaktivität aller Trials, wurden der einen Testgruppe zugeordnet. Die zweite Testgruppe setzt sich aus allen Trials zusammen, deren Populationsaktivität geringer ist, als das 35% Perzentil der Populationsaktivität aller Trials.

Zur Veranschaulichung wurden alle Kamerabilder der jeweiligen Testgruppe aufgemittelt, um die Aktivität des spontan aktiven und spontan inaktiven Kortex zu zeigen.

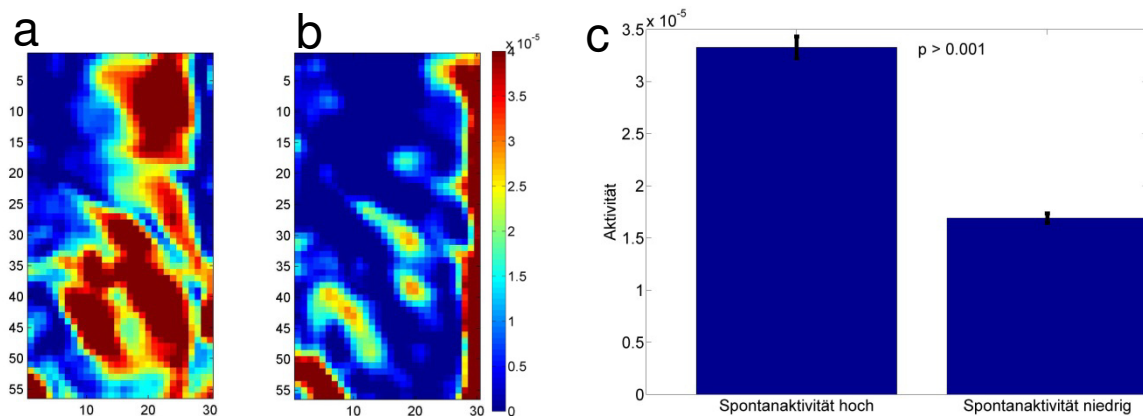


Abbildung 40: Unterteilung der Daten in Testgruppen

Zur Veranschaulichung wurden alle Kamerabilder des spontan aktiven (a) und des spontan inaktiven Kortex (b) aufgemittelt. Die Karten repräsentieren die jeweilige Testgruppe. Abbildung c) zeigt die Aktivität gemittelt über alle Pixel des spontan aktiven und des spontan inaktiven Kortex. (Fehlerbalken = SEM). Die Aktivitätsunterschiede zwischen beiden Testgruppen sind signifikant (Mann-Whitney-U Test).

Wie zuvor schon erwähnt, sollte überprüft werden, ob das Maß an Spontanaktivität vor der Stimulation die Populationsaktivität während der Stimulation beeinflusst. Daher wurde in Folge die Populationsaktivität eines jeden Trials während der Stimulationsphase ermittelt und der entsprechenden Testgruppe zugeordnet (Spontanaktivität hoch oder niedrig). Diese Zuordnung war möglich, da jeder Trial sich aus 500 ms Baseline (Spontanaktivität) mit darauffolgender Stimulation (1 s) zusammensetzt.

6.2.3.1 Korrelation der spontanen Schwankungen mit den Schwankungen der evozierten Aktivität

Wie in *Abbildung 32* dargestellt, variiert die Stärke der evozierten Aktivität von Aufnahmesequenz zu Aufnahmesequenz. Des Weiteren wurde gezeigt, dass innerhalb der Spontanaktivität Phasen mit hoher und geringer Aktivität auftreten (*Abbildung 39*). Daher existiert die hohe Trial-to-Trial Variabilität nicht nur während der Stimulation, sondern auch in der Baseline ohne visuelle Stimulation. Um zu klären, ob diese beiden Beobachtungen zusammenhängen, wurde quantitativ untersucht, ob die Höhe der Spontanaktivität vor der Stimulation die Antwortstärke auf den Stimulus beeinflusst.

Die Datenanalyse bestätigt einen Zusammenhang zwischen den spontanen Schwankungen und den Schwankungen der evozierten Aktivität. Ist während der Baseline die Spontanaktivität in Area 18 hoch, dann ist auch die Antwortstärke auf die darauffolgende Stimulationsphase erhöht (*Abbildung 41*). Die Antwortstärke im Experiment 030512 ist um 25 % erhöht, die im Experiment 112511 um 16%. Der Unterschied ist in beiden Experimenten statistisch hoch signifikant, die p-Werte sind kleiner 0.01. Umgekehrt ist bei geringer Spontanaktivität in Area 18 auch die evozierte Aktivität durch den Stimulus geringer.

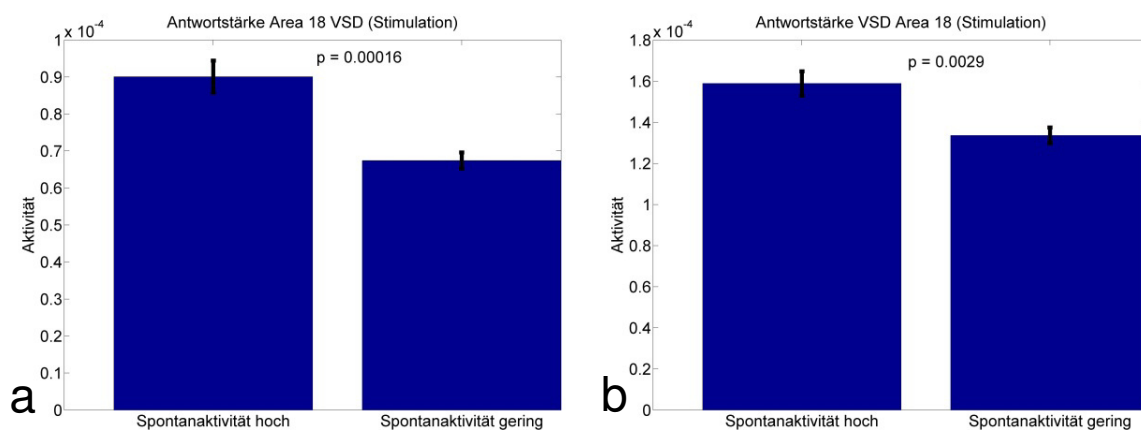


Abbildung 41: Die Antwortstärke in Abhängigkeit von der Spontanaktivität

Während Phasen hoher Spontanaktivität in Area 18 ist die Antwortstärke der Neurone auf den dargebotenen Stimulus signifikant erhöht (Mann-Whitney-U Test, $p < 0,01$). Während Phasen hoher Spontanaktivität ist die evozierte Aktivität in Experiment 030512 um 25% (a) und in Experiment 112511 um 16% (b) erhöht im Vergleich zur evozierten Aktivität während Phasen geringer Spontanaktivität. (Fehlerbalken=SEM).

Um zu klären, ob während Phasen hoher Spontanaktivität in Area 18 auch eine erhöhte Spontanaktivität in einem hierarchisch übergeordneten visuellen Areal festzustellen ist, wurde die spontane Spikerate in PMLS bestimmt. Wie *Abbildung 42* zeigt, ist bei erhöhter Spontanaktivität in Area 18 auch die Spontanaktivität in PMLS erhöht. Die spontane Feuerrate ist um 33% erhöht, der Unterschied ist statistisch signifikant (p -Wert = 0.0356).

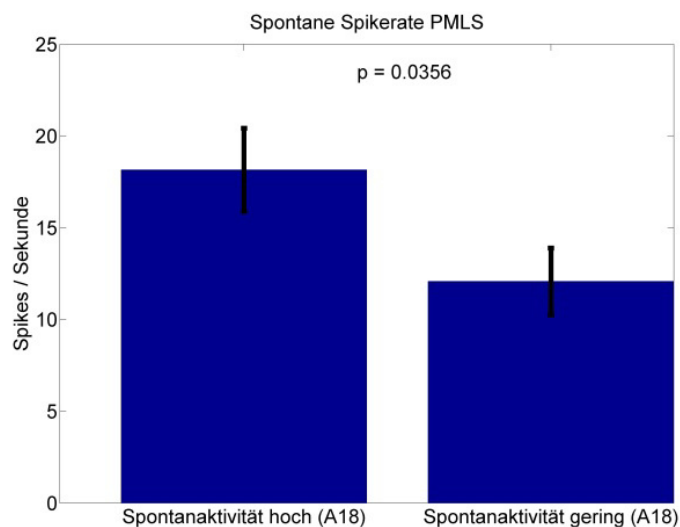


Abbildung 42: Die spontane Feuerrate in Abhängigkeit von der Spontanaktivität

Während Phasen hoher Spontanaktivität in Area 18 ist auch die Spontanaktivität in PMLS signifikant um 33% erhöht (Mann-Whitney-U Test, $p < 0,05$), im Vergleich zu Phasen geringer Spontanaktivität. Die Aktivität in PMLS wurde mittels elektrophysiologischer Ableitungen ermittelt. Die spontane Feuerrate der abgeleiteten Neurone reflektiert die Spontanaktivität. (Fehlerbalken=SEM).

6.2.3.2 Oszillatorische Schwankungen

Um herauszufinden, ob die mittels VSD visualisierten Schwankungen innerhalb der Spontanaktivität auch in neuronalen Oszillationen wiederzufinden sind, wurden zusätzlich die LFP- und EEG Signale der Elektroden in Area 18 und PMLS analysiert. Die Signale wurden in ihre einzelnen Frequenzbänder zerlegt und es wurde überprüft, ob es Aktivitätsunterschiede innerhalb der Frequenzbänder gibt. Ein signifikanter Unterschied konnte nur für das Alpha-Band festgestellt werden. Die weitere Analyse beschränkte sich daher nur auf das Alpha-Band und es wurde die Hypothese überprüft, ob die oszillatorische Aktivität im Alpha-Band die kortikale Erregbarkeit der Neurone beeinflusst (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013).

Experiment 030512:

Ein signifikanter Unterschied in der Aktivität und somit ein Zusammenhang zu den Schwankungen in der Spontanaktivität konnte für das Alphaband festgestellt werden. *Abbildung 43* zeigt, dass die Amplitude der Spontanaktivität in Area 18 und die Power im Alphaband antikorreliert sind. Im spontan gering aktiven Kortex ist die Alhpower um 21 % im Verhältnis zum spontan hoch aktiven Kortex erhöht. Der Unterschied ist für die erhobenen Daten mittels EEG und LFP Elektrode signifikant (Mann-Whitney-U Test, $p < 0.01$). Mit Hilfe der optischen Daten konnte die Alphaaktivität in über 1000 Ableitpunkten räumlich hoch aufgelöst visualisiert werden. Auch die optischen Daten belegen, dass während Phasen geringer Spontanaktivität die Alphaaktivität um ~ 20 % erhöht ist (*Abbildung 44*).

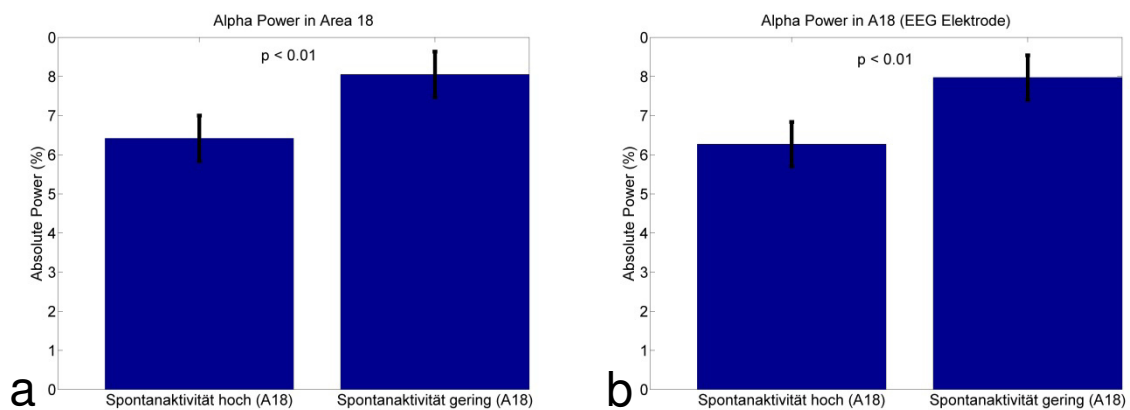


Abbildung 43: Zusammenhang zwischen der Spontanaktivität und der Aktivität im Alpha-Band

Die Auswertung der Daten von den in Area 18 implantierten LFP (a) und EEG (b) Elektroden hat ergeben, dass die oszillatorische Aktivität im Alphaband und die neuronale Spontanaktivität ermittelt durch VSD-Imaging antikorreliert sind. Während Phasen geringer Spontanaktivität ist in Area 18 die Power im Alphaband um ca. 20 % erhöht. (Fehlerbalken=SEM). Die ermittelten Aktivitätsunterschiede im Alpha-Band sind signifikant (Mann-Whitney-U Test, $p < 0.01$).

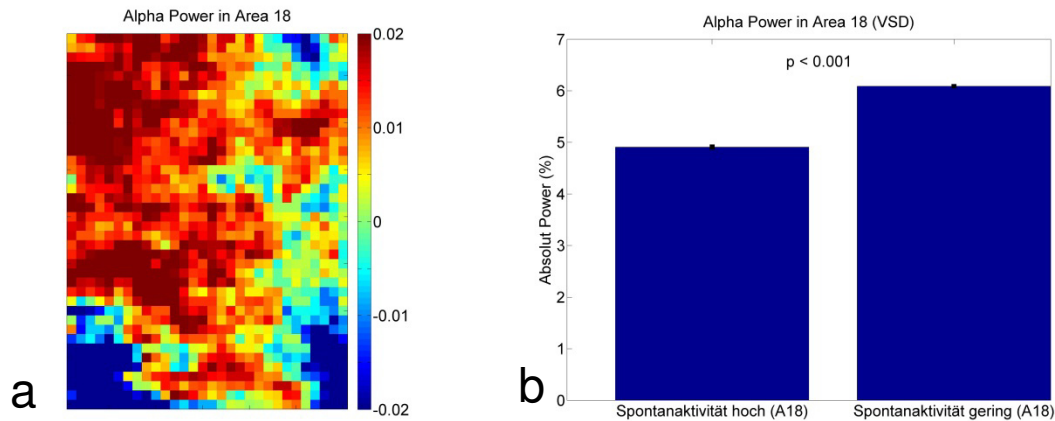


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen der Spontanaktivität und der Aktivität im Alpha-Band

Das gleiche Ergebnis, wie zuvor in Abbildung 43 dargestellt, wurde durch Ermittlung der oszillatorischen Aktivität im Alphaband in den optischen Daten erbracht. Die Alphaaktivität wurde räumlich hoch aufgelöst für $n > 1000$ Ableitpunkte (Pixel) ermittelt.

a) Pixel mit Werten > 0 zeigen Bereiche mit hoher Alphaaktivität während Phasen geringer Spontanaktivität. Pixel mit Werten < 0 zeigen Bereiche in Area 18 mit geringer Alphaaktivität, während Phasen hoher Spontanaktivität.

b) Während Phasen geringer Spontanaktivität ist in Area 18 die Power im Alphaband um ca. 20% erhöht, der Unterschied ist signifikant (Mann-Whitney-U Test, $p < 0.001$). Die Analyse der optischen Daten Abbildung 44, der LFP Daten (Abbildung 43a) und der EEG Daten (Abbildung 43b) liefert das gleiche Ergebnis. (Fehlerbalken=SEM).

Das gleiche Ergebnis liefert die Analyse der LFP Daten aus PMLS. Wie schon in Abbildung 42 gezeigt, korreliert die Spontanaktivität von PMLS mit der in Area 18. Dies gilt auch für die oszillatorische Aktivität im Alphaband. Im spontan inaktiven Kortex ist die Alphapower um 25 % erhöht (Abbildung 45). Der Unterschied ist statistisch signifikant, der p-Wert ist kleiner 0.01 (Mann-Whitney-U Test).

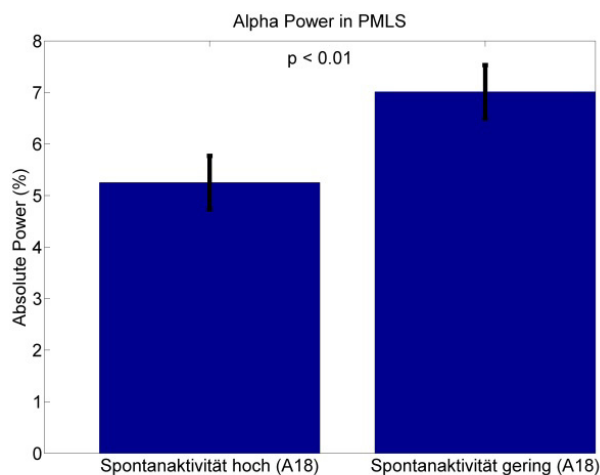


Abbildung 45: Im spontan inaktiven Kortex ist die Alphapower nicht nur in Area 18 (Abbildung 42), sondern auch in PMLS signifikant um 25% erhöht (Mann-Whitney-U Test, $p < 0.01$). Die Alphapower in PMLS wurde mittels elektrophysiologischer Ableitungen ermittelt. (Fehlerbalken=SEM).

Zur Veranschaulichung wird in *Abbildung 46* die Alphaaktivität in Area 18 als Spektrogramm dargestellt. Dabei wurde die oszillatorische Aktivität 500 ms vor Stimulationsbeginn im Frequenzbereich zwischen 8 und 24 Hz, jeweils für den spontan aktiven (a) und spontan gering aktiven Kortex (b) visualisiert.

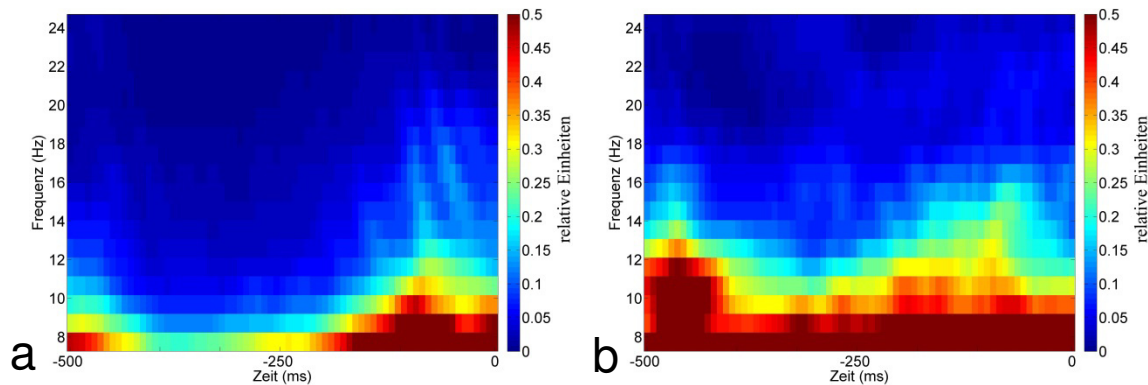


Abbildung 46: Spektrogramme kortikaler Aktivität bei hoher und geringer Spontanaktivität

Dargestellt ist die oszillatorische Aktivität im spontan aktiven (a) und im spontan inaktiven Kortex (b) über den Zeitraum von 500 ms vor Einsatz der Stimulation. Die oszillatorische Aktivität im Alfaband (7-14 Hz) ist im spontan aktiven Kortex (a) über den gesamten Zeitraum geringer, als im spontan inaktiven Kortex (b).

Experiment 112511:

Die Ergebnisse der Experimente 112511 und 030512 sind nahezu identisch. Lediglich der Frequenzbereich ist leicht verschoben, die Effekte in Bezug auf die Spontanaktivität konnten hier im Frequenzbereich von 12-18 Hz gezeigt werden. Der Bereich entspricht dem schnellen Alpha und langsamen Beta Frequenzband. Wie in *Abbildung 47* dargestellt, ist die Alphaaktivität während Phasen geringer Spontanaktivität in Area 18 um 27% und in PMLS um 31% signifikant erhöht (Mann-Whitney-U Test). Auch aus der Analyse der optischen Daten geht hervor, dass die Alphaaktivität signifikant um 20% erhöht ist (*Abbildung 48*).

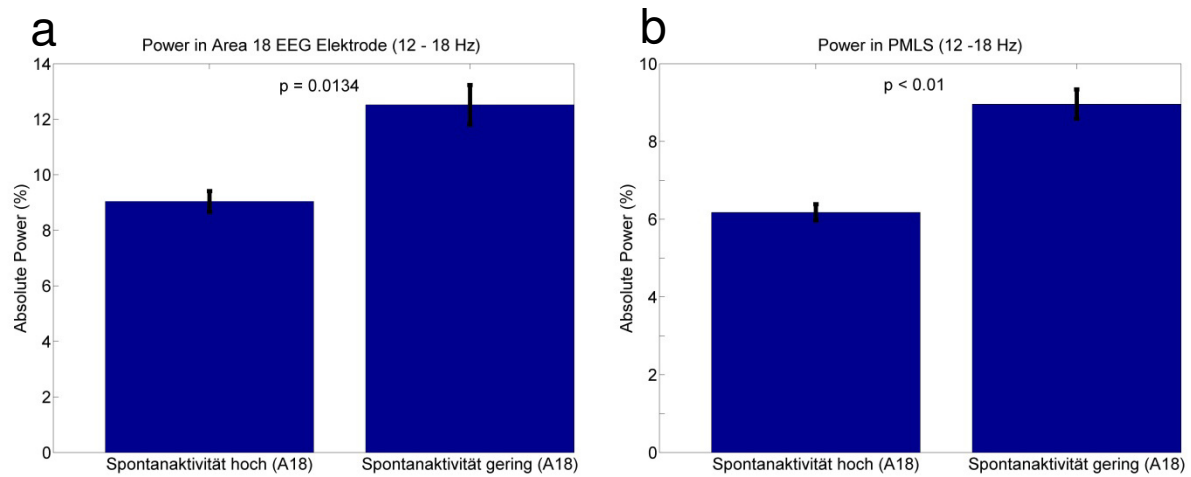


Abbildung 47: Zusammenhang zwischen der Spontanaktivität und der Aktivität im Alpha-Band

Die Auswertung der in Area 18 implantierten EEG (a) und in PMLS implantierten LFP (b) Elektroden hat ergeben, dass die oszillatorische Aktivität im Frequenzbereich zwischen 12 und 18 Hz und die neuronale Spontanaktivität ermittelt durch VSD-Imaging antikorreliert sind. Während Phasen geringer Spontanaktivität in Area 18 ist in PMLS und in Area 18 die Power im Alphaband signifikant um ca. 30% erhöht. (Fehlerbalken=SEM, Mann-Whitney-U Test).

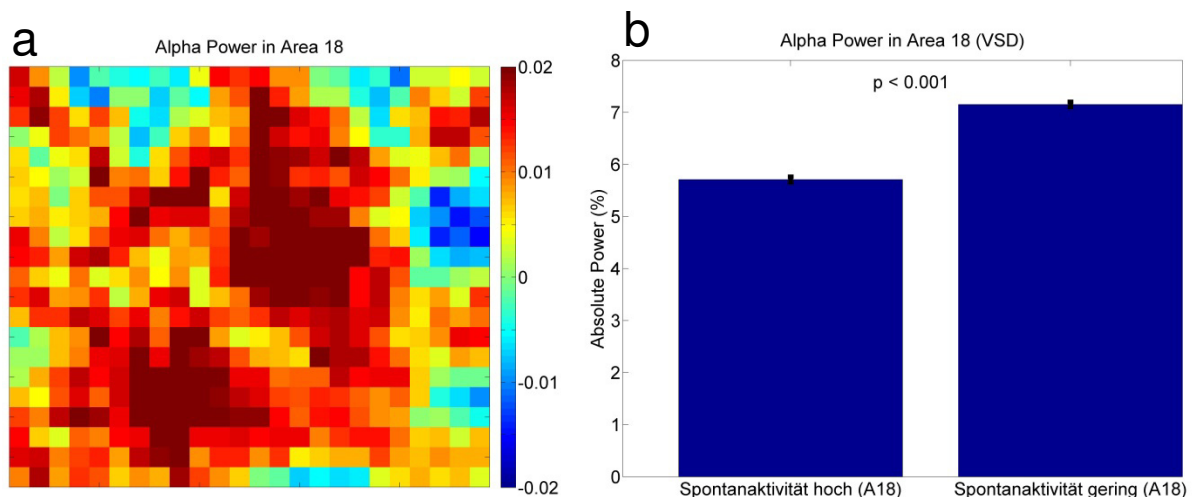


Abbildung 48: Zusammenhang zwischen der Spontanaktivität und der Aktivität im Alpha-Band

Die Auswertung der Daten von den in Area 18 und PMLS implantierten LFP und EEG Elektroden hat ergeben, dass die oszillatorische Aktivität im Alphaband und die neuronale Spontanaktivität ermittelt durch VSD-Imaging antikorreliert sind. Das gleiche Ergebnis wurde durch Ermittlung der oszillatorischen Aktivität im Alphaband in den optischen Daten erbracht. Die Alphaaktivität wurde räumlich hoch aufgelöst für $n > 500$ Ableitpunkte (Pixel) ermittelt.

a) Pixel mit Werten > 0 zeigen Bereiche mit hoher Alphaaktivität während Phasen geringer Spontanaktivität. Pixel mit Werten < 0 zeigen Bereiche in Area 18 mit geringer Alphaaktivität während Phasen hoher Spontanaktivität.

b) Während Phasen geringer Spontanaktivität ist in Area 18 die Power im Alphaband um ca. 20% erhöht. Die Analyse der optischen Daten (Abbildung 48b), der EEG Daten (Abbildung 47a) und der LFP Daten (Abbildung 47b) liefern tendenziell das gleiche Ergebnis. (Fehlerbalken=SEM, Mann-Whitney-U Test = $p < 0.001$).

6.2.3.3 Interaktion von Area 18 und PMLS (Experiment 030512)

Wie im vorherigen Teil beschrieben, ist bei erhöhter Spontanaktivität in Area 18 auch die Spontanaktivität in PMLS erhöht (*Abbildung 42*). Ebenfalls wurde gezeigt, dass in beiden Arealen im Falle von geringer Spontanaktivität die Power im Alphaband erhöht ist. Um eine mögliche Interaktion zwischen beiden Arealen im Bereich des Alphabandes nachzuweisen, wurde zunächst die Alphapower beider Areale auf Single Trial Niveau gegeneinander aufgetragen (*Abbildung 49*) und der R-Wert und der Korrelationskoeffizient bestimmt. Mit Hilfe des Scatterplots kann überprüft werden, ob die Aktivitäten auf Single Trial Niveau in beiden Arealen miteinander korreliert sind und ob sich während den Phasen von hoher und geringer Spontanaktivität die Korrelation verändert.

Wie *Abbildung 49* zeigt, gibt es in Bezug auf die Alphapower während Phasen geringer Spontanaktivität eine höhere Korrelation zwischen beiden Arealen, als während Phasen hoher Spontanaktivität. Während Phasen geringer Spontanaktivität ist der R-Wert bezogen auf die Alphapower annähernd dreimal so hoch ($R^2=0.37$) verglichen mit den Phasen hoher Spontanaktivität ($R^2=0.13$). Die Korrelationskoeffizienten sind entsprechend 0.61 (Spontanaktivität gering) und 0.36 (hohe Spontanaktivität). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Verhalten beider Areale zueinander in Bezug auf die Alphaaktivität während Phasen von geringer Spontanaktivität stärker korreliert ist.

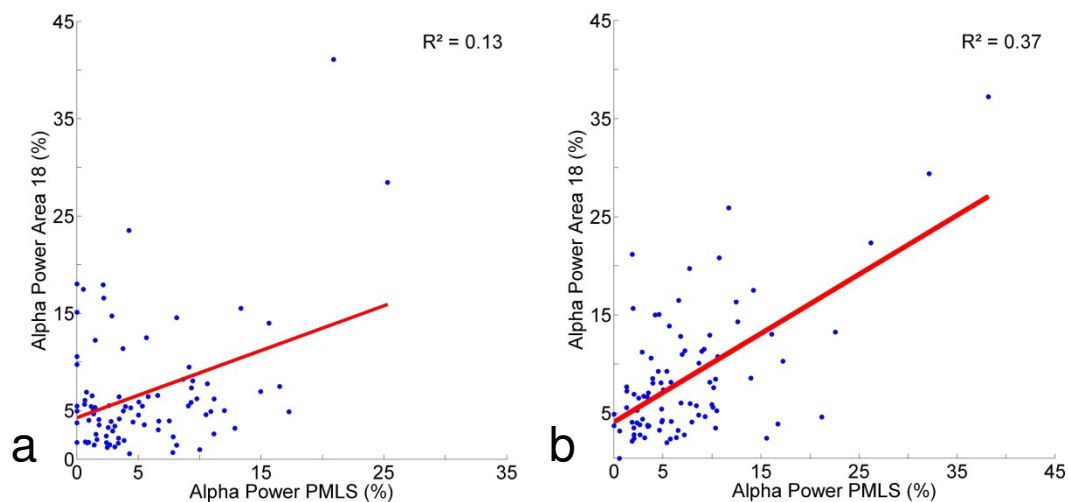


Abbildung 49: Korrelation der Aktivität im Alphaband von Area 18 und PMLS auf Single Trial Niveau

Die Alphapower in PMLS und Area 18 eines jeden Trials während Phasen hoher (a) und Phasen geringer Spontanaktivität (b) wurde gegeneinander aufgetragen. Während Phasen geringer Spontanaktivität und somit hoher Alphaaktivität ist die Korrelation bezüglich der Alphaaktivität zwischen Area 18 und PMLS dreimal so hoch ($R^2=0.37$) im Vergleich zu Phasen hoher Spontanaktivität ($R^2=0.13$).

6.2.3.4 Kohärenzanalyse (Experiment 030512)

Wie die Korrelation der Alphaaktivität zwischen den beiden Arealen zeigt, sind die Aktivitätsmuster in Area 18 und PMLS sehr ähnlich, obwohl kein Stimulus dargeboten wurde und der Kortex nur spontan aktiv ist. Um eine Interaktion zwischen den Netzwerken beider Areale weiter zu untersuchen, wurde eine Kohärenzanalyse durchgeführt. Wie im Methodenteil bereits beschrieben, gibt die Kohärenz die Phasengleichheit für jede Frequenz zwischen zwei Neuronenverbänden an und ist somit ein Maß für deren Interaktion (Fries, 2005). Eine Kohärenz von 1 steht für absolute Phasengleichheit, eine Kohärenz von 0 bedeutet, dass beide Phasen maximal verschoben sind. Über den Phasenverschiebungswinkel Φ kann die zeitliche Differenz beider Phasen ermittelt werden.

Die Kohärenzanalyse verzeichnet eine hohe Kohärenz von > 0.5 zwischen Area 18 und PMLS im Alphabereich (9-10 Hz) während Phasen geringer Spontanaktivität (*Abbildung 50*). In diesem Frequenzbereich ist die Kohärenz während Phasen geringer Spontanaktivität um ca. 22%, verglichen mit der Kohärenz zwischen PMLS und Area 18 während Phasen hoher Spontanaktivität, erhöht.

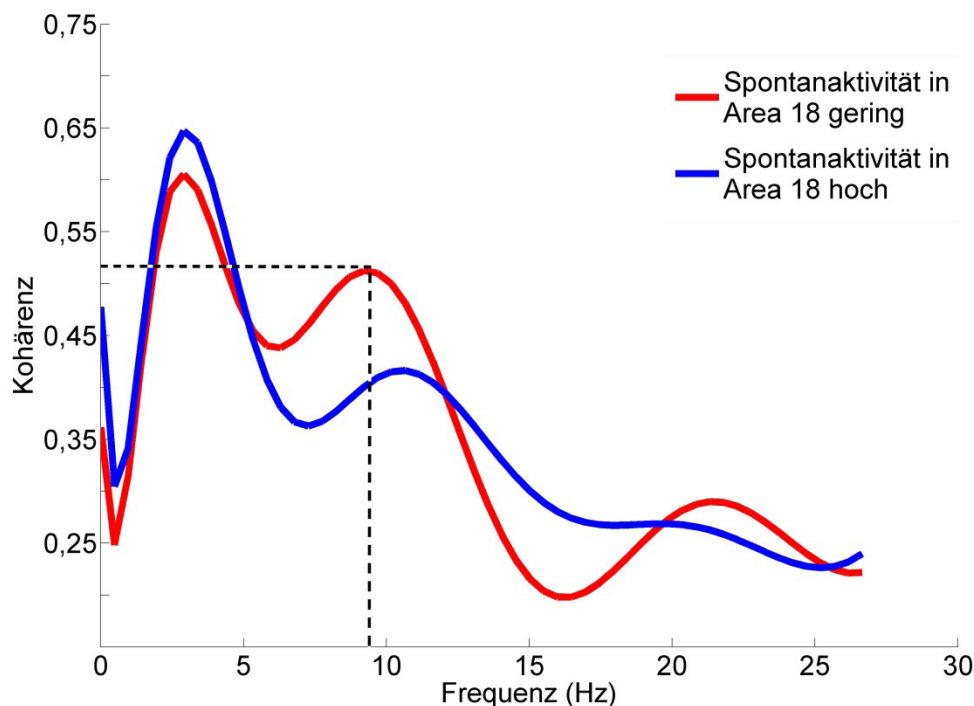


Abbildung 50: Kohärenzanalyse zwischen den neuronalen Netzwerken in Area 18 und PMLS

In der Abbildung ist dargestellt, dass während Phasen geringer Spontanaktivität und somit hoher Alphaaktivität die Kohärenz zwischen den neuronalen Netzwerken in Area 18 und PMLS im Frequenzbereich zwischen 9 und 10 Hz um 22% erhöht ist (rot) im Vergleich zu Phasen geringer Alphaaktivität und somit hoher Spontanaktivität (blau).

Die Berechnung des Phasenverschiebungswinkels hat ergeben, dass während Phasen geringer Spontanaktivität und einer hohen Kohärenz im Alphabereich die Phasen der Alphaamplituden von PMLS und Area 18 um 12 ms verschoben sind – und dass die Alphaaktivität von PMLS ausgeht.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der oszillatorischen kortikalen Aktivität, dass sowohl die Aktivität (*Abbildung 43*) als auch die Kohärenz von PMLS und Area 18 im Alphabereich während Phasen geringer Spontanaktivität um ca. 20 % erhöht ist (*Abbildung 50*).

6.3 Histologie

Um zu verifizieren, dass die abgeleiteten elektrophysiologischen Daten auch tatsächlich aus dem PMLS-Kortex stammen, wurde dieser histologisch analysiert und dreidimensional rekonstruiert. Anhand der Koordinaten von den Stichkanälen und der Koordinaten von grauer und weißer Substanz im dreidimensionalen Modell konnte verifiziert werden, dass sich alle ausgewerteten Elektroden von Experiment 112511 und 030512 innerhalb des PMLS-Kortex befanden. Darüber hinaus konnte anhand der Koordinaten nachgewiesen werden, dass die Elektroden innerhalb der grauen Substanz positioniert waren und nicht bis in die weiße Substanz vorgedrungen sind. Die *Abbildung 51* zeigt exemplarisch einen Stichkanal im PMLS-Kortex aus Experiment 030512, den entsprechenden rekonstruierten Gewebeschnitt und das dreidimensionale Modell dazu. Die *Abbildung* zeigt deutlich, dass sich der Stichkanal der Elektrode Nr.1 innerhalb der grauen Substanz des PMLS-Kortex befand.

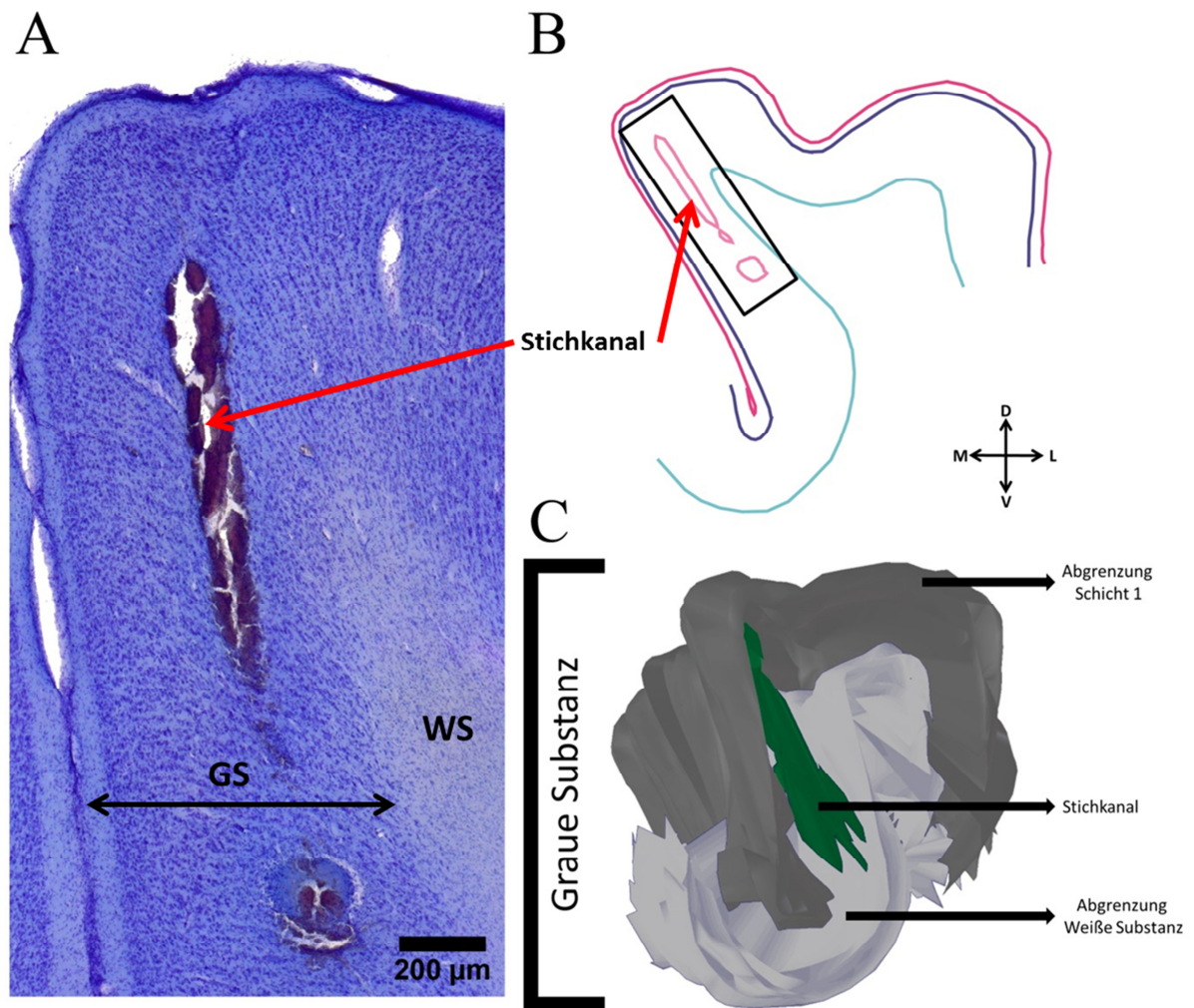


Abbildung 51: Histologische Auswertung eines Stichkanals

In A) ist die kortikale Läsion durch die Elektrodenpenetration in PMLS dargestellt (GS = Graue Substanz; WS = Weiße Substanz). Der Gewebeschnitt wurde kresylviolett gefärbt (Nissl Färbung). Abbildung B) zeigt den entsprechenden rekonstruierten Schnitt. Abbildung C) zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion des PMLS-Kortex basierend auf allen histologischen Schnitten. In grün dargestellt ist der Stichkanal hervorgerufen durch die PMLS-Elektrode Nr.1, die in Experiment 030512 ausgewertet wurde. Die Rekonstruktion zeigt, dass sich der Stichkanal in der grauen Substanz des PMLS Kortex befand und die Elektrode nicht in die weiße Substanz vorgedrungen ist. Verifiziert werden konnte dies anhand der Koordinaten von Stichkanal und der Abgrenzung zur weißen Substanz.

7 Diskussion

Neuronale Antworten auf sensorische Stimuli unterliegen einer hohen Variabilität, die auch in den vorliegenden Daten zu beobachten war. Diese Variabilitäten können sowohl auf externe Störsignale als auch auf intern generierte neuronale Ursachen zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst zahlreiche externe Ursachen für die Variabilitäten untersucht und eliminiert. Die in Frage kommenden Rauschquellen lagen neben dem Herzschlagartefakt im Wesentlichen im Bereich der Aufnahmetechnik.

7.1 Die Beseitigung von Artefakten

7.1.1 Independent Component Analyse

Die Mittels *Optical Imaging* gewonnen neuronalen Daten beinhalten ein biologisches Artefakt, das aus dem Herzschlag des Versuchstieres resultiert. Wie in Ergebnisteil dargestellt, lässt sich das Herzschlagartefakt mit Hilfe der ICA beseitigen, wodurch sich die Datenqualität signifikant erhöht (*Abbildung 30*). Die Methodik der ICA ist die Methode der Wahl, wenn es aus technischen Gründen nicht möglich ist, durch Synchronisation des Herzschlags mit der Aufnahmeeinheit und durch Subtraktion eines *Blank-Trials* dieses Artefakt zu beseitigen. Über das Artefakt des Herzschlags hinaus, ist es durch Anwendung der ICA auch möglich, Artefakte durch die Beatmung des Versuchstieres zu beseitigen (Maeda et al., 2001, Inagaki et al., 2003). Da die Atemfrequenz allerdings zwischen 10 und 15 Zyklen pro Minute beträgt, müsste dafür die Dauer einer Aufnahmesequenz erheblich erhöht werden. Die vollständige Abbildung des Atemartefakts bei einer Atemfrequenz von 10–15 Zyklen pro Minute erfordert einen Aufnahmezeitraum von 4-6 Sekunden. Um ein zyklisches Artefakt mit Hilfe der ICA einwandfrei detektieren zu können, sollte eine Aufnahmesequenz mindestens 2 Zyklen dieses Artefaktes beinhalten, was konkret zu einer Trialdauer von 8-12 Sekunden führt. Praktikabler ist es daher, eine triggerbare Atempumpe während der Aufnahmen auszuschalten, da so kein Atemartefakt entsteht und die Trialdauer flexibel an den experimentellen Ansatz angepasst werden kann. Dieser Lösungsweg wurde auch in der zweiten Phase der Experimente eingeschlagen.

Die Dauer der Meßphasen in einem VSD-Experiment ist sehr begrenzt, denn die Farbstoffmoleküle werden aufgrund der starken Beleuchtung nach und nach zerstört und zusätzlich durch zelluläre Stoffwechselprozesse abgebaut. Hier bietet die Anwendung des Algorithmus der ICA einen Vorteil. Um das Herzschlagartefakt mittels Subtraktion der *Blank* Methode zu beseitigen, werden Aufnahmesequenzen ohne Stimulation (*Blank*) benötigt. Mit

Hilfe der ICA ist es möglich, das Herzschlagartefakt auch ohne Subtraktion der *Blank* Methode zu beseitigen (Inagaki et al., 2003), wodurch wesentlich mehr Daten im gleichen Zeitraum gemessen werden können. Für die Experimente 030512 und 112511 wurde dennoch die *Blank* Methode bevorzugt, da die ICA zwei große Nachteile mit sich bringt. Zum einen ist es nicht möglich, die Problematik des *Bleaching* zu beheben, zum anderen erfordert die Anwendung der ICA eine hohe Rechenleistung des Computers und viel Rechenzeit bei einem hochauflösenden Kamerasystem (>5000 Pixel). Auf einem PC mit 8 Prozessoren (Intel Core i7 870@ 2.93 GHz) und 16 GB Arbeitsspeicher erfordert die Anwendung der ICA auf eine einzelne Aufnahmesequenz von 1 Sekunde ca. 55 Minuten. Übertragen auf die Experimente 140709 und 121409 betrug der benötigte Rechenzeitraum für die reine Anwendung des Algorithmus 420 Stunden. Nach diesem Zeitraum kann das Ergebnis der ICA überhaupt erst analysiert und interpretiert werden. Für den Alltag ist die Methode trotz ihrer Effektivität und der Vorteile zu zeitaufwendig, wenn nicht die Möglichkeit des Zugriffs auf einen externen Hochleistungsrechner besteht.

7.1.2 Die Vermeidung von Artefakten

Wie bereits zuvor diskutiert wurde, ist es mit Hilfe der ICA möglich, neuronale Daten von biologischen Artefakten nachhaltig zu befreien. Trotz ihrer Effektivität ist die Methodik der ICA sehr aufwendig und zeitintensiv. Um schon im Vorfeld eine Kontamination mit biologischen Artefakten zu umgehen, wurden für die Experimente mit dem neuen Kamerasystem alle beteiligten Aufnahmeeinheiten neu synchronisiert. Eine Verunreinigung der gewonnenen Daten durch die Beatmung des Tieres konnte vermieden werden, in dem während der Aufnahmesequenzen die Atempumpe ausgeschaltet wurde. Darüber hinaus hat sich durch die Synchronisation von EKG und Aufnahmeeinheit der Kamera die Möglichkeit ergeben, das Herzschlagartefakt auch ohne ICA zu beseitigen. Durch die Synchronisation des Imager 3001 mit dem EKG startet eine Aufnahmesequenz immer zur gleichen Phase des Herzschlags. Dies gilt sowohl für die Trials unter Stimulation als auch für die *Blank-Trials*. Durch Subtraktion des *Blank-Trials* von den Trials unter Stimulation kann das Herzschlagartefakt beseitigt werden. Durch beide beschriebenen Methoden lassen sich die Störsignale von Herzschlag und Beatmung des Tieres vermeiden. Um die Datenqualität noch weiter zu optimieren, besteht nun nur noch die Möglichkeit, die technischen Störsignale bestmöglich zu minimieren.

7.1.3 Modernisierung der Aufnahmetechnik

Technisch bedingte Störsignale lassen sich nur durch eine Optimierung der Aufnahmetechnik minimieren. Um eine Analyse auf Single Trial Niveau zu ermöglichen,

wurde nach dem Studium technischer Störsignale eine neue Kamera in das Aufnahmesystem integriert. Um eine ideale Kamera für das VSD-Imaging zu finden, müssen mehrere Parameter beachtet werden. Der das VSD-Imaging maßgeblich limitierende Faktor ist der sogenannte *Shot Noise*, der durch zeitliche und räumliche Fluktuationen im Licht entsteht. Beim VSD-Imaging lässt sich der *Shot Noise* minimieren, indem man unter sehr hohen Lichtverhältnissen arbeitet, da das Verhältnis von Signal zu *Shot Noise* ansteigt, je mehr Photonen von einem Pixel des Kamerachips erfasst werden. Eine geeignete Kamera muss folglich einen Sensor verbaut haben, der eine hohe Anzahl von Photonen akkumulieren kann, ohne zu übersättigen. Das maximale Fassungsvermögen von Photonen eines Pixels wird als *well depth* bezeichnet. Die *well depth* wiederum wird durch die *Quantum Efficiency (QE)* beeinflusst. Die QE ist der prozentuale Anteil der Photonen des Signals, die tatsächlich vom Sensor erfasst wird. Unter Rückbesichtigung dieser Parameter wurde das bestehende Kamerasystem in unserem Labor modernisiert und eine neue Kamera in das System integriert. Die *well depth* wurde so von zuvor 3,5 Millionen Elektronen pro Pixel auf 15,6 Millionen Elektronen pro Pixel erhöht. Das mit Hilfe der spannungsabhängigen Farbstoffe messbare neuronale Signal entspricht in etwa einem Tausendstel der gesamten Lichtmenge (Shoham et al., 1999). Rein rechnerisch erhöhte sich so durch das neue Kamerasystem das Verhältnis von Signal zu Shot Noise von ~1.9 auf ~ 4.

$$\frac{Signal}{Shot\ Noise} = \frac{(Signal \div 1000)}{\sqrt{Signal}}$$

Nach der Eliminierung biologischer Artefakte und Optimierung der Aufnahmetechnik waren schlussendlich Analysen auf Single Trial Niveau möglich und es konnte der Frage nachgegangen werden, ob die in den Daten vorhandenen Variabilitäten auf neuronale Ursachen zurückzuführen sind.

7.2 Analyse der Trial-to-Trial Variabilität

Die zuvor beschriebenen Optimierungen der Aufnahmetechnik führten zu Daten mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis und ermöglichten eine Analyse auf Single Trial Niveau. Die Analyse hat ergeben, dass auch diese Daten einer hohen Trial-to-Trial Variabilität unterliegen. Auf dieser Basis wurde die Hypothese generiert, dass interne neuronale Prozesse diese Variabilität maßgeblich beeinflussen. Ein in diesem Kontext sehr wichtiger

Faktor ist die neuronale Spontanaktivität, die der Stimuluspräsentation vorhergeht. Diese Hypothese und die Hypothese, dass die Spontanaktivität und ihre Variabilität wiederum die verschiedenen *brain states* reflektiert, wird auch von anderen Autoren geteilt (Fries et al., 2001a, Ergenoglu et al., 2004, Womelsdorf et al., 2006, McMains et al., 2007, Sestieri et al., 2008, van Dijk et al., 2008).

Um den Einfluss der Spontanaktivität auf die Variabilität zu untersuchen, wurde daher der Datensatz in zwei Testgruppen aufgeteilt, eine Testgruppe mit hoher – und eine Testgruppe mit geringer Spontanaktivität innerhalb der Baseline vor Stimulusbeginn.

Dabei zeigte sich, dass die Antwortstärke in Area 18 auf den Stimulus deutlich erhöht war, wenn auch in der Baseline eine hohe Spontanaktivität zu verzeichnen ist. Das Resultat ist ein Hinweis darauf, dass die hohe Trial-to-Trial Variabilität auf Modulationen der Spontanaktivität zurückzuführen sind. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Arieli (Arieli et al., 1996). Arieli konnte in seiner Studie sowohl in den optischen Karten als auch in der Feuerrate einzelner Neurone zeigen, dass die Stimulus-evozierte Aktivität höher ist, wenn in der Baseline des Trials eine hohe Spontanaktivität zu verzeichnen war. Nach diesem vorgeschlagenen Erklärungsansatz von Arieli reitet die evozierte Aktivität auf einen Stimulus sinnbildlich auf der Welle der Spontanaktivität. Die Variabilitäten der Stimulusantworten lassen sich mit diesem Modell erklären. Arieli beschreibt die Spontanaktivität als Welle. Die Phasen hoher und geringer spontaner Aktivität entsprechen dem Wellental oder dem Wellenkamm. Trifft nun der Stimulus auf einen bestimmten Zeitpunkt dieser Welle, ist die gemessene evozierte Aktivität davon abhängig, ob der Stimulus auf einen Wellenkamm oder auf ein Wellental trifft. Die evozierte Aktivität ist nach Arieli relativ konstant, wobei eine Erhöhung oder Erniedrigung der evozierten Aktivität dem Maß an vorherrschender Spontanaktivität zuzuschreiben ist. Zusammengefasst beschreibt diese Hypothese einen additiven Mechanismus der Spontanaktivität.

In meiner Auswertung habe ich den Einfluss der globalen Spontanaktivität studiert, die spontane Aktivität aller Pixel innerhalb des abgeleiteten Areals wurde integriert. Unter diesen Analysebedingungen ist der von Arieli beschriebene additive Mechanismus der Spontanaktivität gültig, meine Ergebnisse lassen sich in das Modell einordnen. Dennoch kann dem Modell des additiven Mechanismus keine Allgemeingültigkeit eingeräumt werden. Arieli verwendete in seinen Experimenten ein 12*12 Photodiodenarray, seine Experimente stützen sich somit auf die Analyse von Signalen aus 144 Pixeln, die räumliche Auflösung ist somit sehr gering.

7.3 Raumzeitliche Muster der Spontanaktivität

Die räumliche Auflösung der in dieser Arbeit analysierten Signale ist um mehr als das 10 fache höher, als in der zuvor beschriebenen Studie von Arieli (Arieli et al., 1996). Dadurch besteht die Möglichkeit, innerhalb der Spontanaktivität nach Mustern zu suchen. Wie *Abbildung 38* und die Publikation (Kenet et al., 2003) zeigen, gibt es Muster innerhalb der Spontanaktivität, die dem Muster an evozierter Aktivität durch einen Stimulus ähneln. Arieli (Arieli et al., 1996) hatte damals in seiner Studie technisch bedingt nicht die Möglichkeit diese Muster zu sehen. Hoch aufgelöst betrachtet, könnte eine Karte mit abweichend hoher Amplitude bei einem rein additiven Mechanismus nur dann existieren, wenn die aufeinander treffenden Muster aus Spontanaktivität und evozierter Aktivität räumlich sehr ähnlich sind oder aber die Spontanaktivität über die gesamte abgeleitete Fläche hoch ist. Aus meinen Beobachtungen kann ich beschreiben, dass solche Muster zwar auftreten, ihre Häufigkeit aber deutlich geringer ist, als das Auftreten der Variabilitäten von Trial-to-Trial. Des Weiteren konnten auch Variabilitäten innerhalb der evozierten Aktivität einer Stimulusrichtung gefunden werden, für die es kein räumliches Analogon innerhalb der analysierten Spontanaktivität gab.

Meine Beobachtungen zu den zeitlichen Dynamiken von Mustern innerhalb der Spontanaktivität wurden in dieser Arbeit statistisch nicht ausgewertet, da mein Fokus auf einen anderen Aspekt innerhalb der Spontanaktivität gerichtet war. Allerdings wäre eine detaillierte raumzeitliche Analyse dieser Muster für nachfolgende Studien von hohem wissenschaftlichem Interesse. Die gefundenen Muster stützen die Hypothese des *predictive coding*, die besagt, dass es antizipatorische Mechanismen im Gehirn gibt (Rao and Ballard, 1999). Nach dieser Theorie senden Areale hoher Ordnung ihre Vorhersage an niedrigere Areal, in denen die Vorhersage und die evozierte Aktivität miteinander verglichen werden. Die Übereinstimmungen oder Diskrepanzen werden anschließend wieder an die höheren Areale über *feedforward* Verbindungen übermittelt (Rao and Ballard, 1999). Eine ähnliche, aber etwas abweichende Hypothese ist das Modell der *Bayesian inference*. Auch in diesem Modell senden höhere Areale ihre Vorhersagen an hierarchisch niedrigere. Allerdings werden nach dieser Theorie nicht die Unterschiede zwischen Vorhersage und evozierter Aktivität errechnet, sondern Bereiche mit Übereinstimmungen werden verstärkt, während Bereiche mit Diskrepanzen unterdrückt werden (Lee and Mumford, 2003). Welche der beiden Theorien den realen Bedingungen im Kortex näher kommt, könnte über eine detaillierte räumliche Analyse der Muster ermittelt werden. Durch das Aufmitteln aller Trials einer Stimulusbedingung ist es möglich, die rein vom Stimulus hervorgerufene Aktivität zu visualisieren. Anschließend ist es möglich, das spontane Muster der Baseline mit der

Aktivität der hoch gemittelten Karte zu verrechnen, da diese nur die durch den Stimulus hervorgerufene kortikale Erregung reflektiert. Vergleicht man nun das daraus entstehende Resultat mit dem räumlichen Muster, welches tatsächlich im Single Trial durch den Stimulus hervorgerufen wurde, könnte man klären, ob das Modell der *Bayesian inference* oder das Modell des *predictive coding* die kortikale Realität besser beschreibt.

7.4 Spontanaktivität und kortikale Oszillationen

Für meine Arbeit sind aber nicht die Muster, sondern die phasischen Schwankungen der Amplitude innerhalb der Spontanaktivität von besonderem Interesse. Der Fokus dieser Arbeit liegt weniger im Mechanismus, wie die Spontanaktivität die Antwortrate der Neurone verändert, sondern darin, wie es überhaupt zu den Schwankungen der Amplitude und somit den Veränderungen in der Erregbarkeit der Neurone in Area 18 kommt. Daher wurde überprüft, ob die Schwankungen der Spontanaktivität und somit die hohe Trial-to-Trial Variabilität ihren Ursprung in neuronalen Oszillationen hat.

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, sind die Phasen hoher und geringer Spontanaktivität auch in den neuronalen Oszillationen erkennbar. Während Phasen von sehr geringer Spontanaktivität in Area 18 ist in diesem Areal die oszillatorische Aktivität im Alfaband signifikant erhöht. Die Ergebnisse stützen sich auf die Auswertung von LFP, EEG und den optischen Daten. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung der optischen Daten konnte die oszillatorische Aktivität im Alfaband, mit mehr als 1000 Ableitpunkten räumlich hoch aufgelöst, visualisiert werden. Dabei war die Alphaaktivität während Phasen geringer Spontanaktivität nicht nur lokal, sondern auch global erhöht.

Die von Berger (Berger, 1929) entdeckten Alpha-Oszillationen wurden ab 1934 (Adrian and Matthews, 1934) bis in die 90er Jahre des letzten Jahrhunderts mit dem sogenannten „idling“ Modus des Gehirns in Zusammenhang gebracht. Der „idling“ Modus besagt, dass inaktive Areale anhand ihrer hohen Alphaamplituden zu identifizieren sind. Eine Erhöhung der Aktivität im Alfaband ist somit das neuronale Korrelat eines deaktivierten kortikalen Netzwerks (Pfurtscheller, 2001). In den letzten Jahren hingegen wurde der Alphaaktivität eine weit größere Rolle zugeschrieben, was schließlich zum Modell der *functional inhibition* geführt hat (Klimesch et al., 2007). Nach diesem Modell reflektiert die Alphaaktivität nicht exklusiv den globalen *brain state*. Nach der *functional inhibition* Hypothese können über Modulationen der Alphaaktivität gezielt kortikale Areale deaktiviert werden. Eine hohe Anzahl an Studien liefern Hinweise darauf, dass die vorherrschende Alphaaktivität vor der Detektion eines Stimulus maßgeblich die darauffolgende Perzeption des Stimulus beeinflusst

(Ergenoglu et al., 2004, Thut et al., 2006, Romei et al., 2008a, van Dijk et al., 2008, Mathewson et al., 2009). Aus all diesen Studien entwickelte sich schlussendlich die Idee, dass die Alphaaktivität direkt die Erregbarkeit der Neurone beeinflusst (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013), was schließlich zu einer hohen Trial-to-Trial Variabilität in Abhängigkeit von der Alphaaktivität führen kann.

Ein direkter Nachweis, dass ein Zusammenhang zwischen Alphaaktivität und der Erregbarkeit der Neurone besteht, konnte bislang jedoch nicht erbracht werden. Genau diesen Nachweis liefern meine Ergebnisse. Das Signal des eingesetzten spannungsabhängigen Farbstoffs stammt weniger aus dem axonalen Antwortverhalten und somit den Spikeraten der Neurone, sondern reflektiert vor allem unterschwellige Membranpotentiale an Dendriten, deren Oberfläche pro Zelle weit größer ist, als die der Axone (Shoham et al., 1999, Petersen et al., 2003). Da die Messung von unterschwelligen Membranpotentialen in direktem Zusammenhang mit dem aktuellen Erregungsgrad der Zellen steht, reflektiert die Amplitude des VSD-Signals während der Spontanaktivität direkt die Erregbarkeit der Neurone im abgeleiteten Bereich. Mit Hilfe des VSD Imagings lässt sich somit in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung die Erregbarkeit der Neurone und simultan die Alphaaktivität in Area 18 messen. Wie in Ergebnisteil gezeigt wurde, ist während Phasen geringer Spontanaktivität, also Phasen erniedrigter Erregbarkeit, die Aktivität im Alphaband signifikant erhöht. Durch meine Ergebnisse kann die Hypothese bestätigt werden, dass während Phasen hoher Alphaaktivität die Erregbarkeit im visuellen Kortex erniedrigt ist (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013).

7.5 Mechanismen der Variabilität von neuronalen Antworten

Um zu klären, welchen Mechanismen die Trial-to-Trial Variabilität unterliegt, wurde in der Literatur nach Gemeinsamkeiten in Bezug auf Variabilitäten gesucht. Auch jenseits des VSD Imaging wurde eine hohe Variabilität innerhalb der Trials in EEG, MEG, und fMRI Experimenten beobachtet und in Zusammenhang mit der Alphaaktivität gebracht. Wie diese Modulationen durch die Alphaaktivität funktionell nach heutigem Stand der Wissenschaft einzuordnen sind, soll nachfolgend dargestellt werden.

Ergenoglu und Uresin haben 2004 (Ergenoglu et al., 2004) in einer humanen EEG Studie eine hohe Fehlerrate beobachtet, wenn Probanden entscheiden sollten, ob ein Stimulus geringer Intensität oder ein gar kein Stimulus auf einem Monitor präsentiert wurde. Als Schwelle wurde eine Stimulusintensität gewählt, bei der das Verhältnis von Treffern und Falschaussagen gleich war. Die Autoren haben gezeigt, dass in Phasen hoher Alphaaktivität

in den okzipitalen Arealen vor der Präsentation von Stimuli mit geringer Intensität diese Stimuli nicht erkannt wurden. Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich die These, dass die Alphaaktivität phasisch die Erregbarkeit der kortikalen Neurone beeinflusst. Die These basiert auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Lopes da Silva (Lopes da Silva, 1991, Stam et al., 1999), dass der Thalamus rhythmisch die Alphaaktivität erhöhen kann und dass dieser Mechanismus ausgehend vom Thalamus als Schranke für eintreffende sensorische Signale auf ihrem Weg zum Kortex dienen könnte. Die Autoren stellen die These auf, dass durch das *gating* des Thalamus (Sherman, 2001, 2004) während der hohen Alphaaktivität die Stimuli niedriger Intensität nicht detektiert werden konnten. In den letzten Jahren konnten weitere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Detektion von Stimuli antikorreliert zur Alpha-Power ist (Thut et al., 2006, Hanslmayr et al., 2007, Romei et al., 2008a, Mathewson et al., 2009, Schroeder and Lakatos, 2009).

In einer MEG Studie (van Dijk et al., 2008) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Vermögen zur Unterscheidung von Stimuli mit schwachem Kontrast in Phasen hoher Alphaaktivität verloren geht. Als Quelle, von der die Alphaaktivität ausgeht, identifizierten die Autoren einen Bereich im Gebiet des Parietooccipitalsulkus, in welchem sie ein kortikales Schrittmacherzentrum vermuten. Sie stellen die Hypothese auf, dass die Alphaaktivität ausgehend von ihrem Ursprung ein *top-down* Prozess zur funktionellen Inhibition der niederen Areale ist und somit der Verstärkungsgrad der visuellen Pfade moduliert werden kann. Der Verstärkungsgrad könnte als Schranke dienen, um den Fluss von Informationen von den okzipitalen Arealen zu den höheren Arealen des dorsalen Pfades zu kontrollieren. Der Fluss von visuellen Informationen könnte so reduziert werden, um nicht störend auf Prozesse in höheren Arealen einzuwirken, wie z.B. der Aufrechterhaltung eines Arbeitsgedächtnisses. Während der Aufrechterhaltung des Arbeitsgedächtnis erhöht sich in den okzipitalen Arealen die Alphaaktivität (Jensen et al., 2002, Tuladhar et al., 2007). Die Kontrolle des Flusses von Informationen ist ein generelles Prinzip im zentralen Nervensystem (Salinas and Thier, 2000) und kann durch Veränderungen der oszillatorischen Eigenschaften beteiligter Netzwerke im Alpha-Band umgesetzt werden (van Dijk et al., 2008).

7.6 Alpha-Oszillationen und Aufmerksamkeit

Das visuelle System erhält fortlaufend visuellen Input. Daher muss es effektive Mechanismen geben, die irrelevante Informationen herausfiltern oder die Prozessierung irrelevanter Inhalte verhindern. Dies ist beispielsweise durch Fokussierung der Aufmerksamkeit möglich. Jensen und Handel haben eine MEG Studie durchgeführt (Handel et al., 2011), in welcher den Probanden in jeder Gesichtshälfte ein Kinematogramm sich bewegender Punkte präsentiert wurde. Die Probanden wurden angewiesen, eines der Kinematogramme zu fokussieren und sich auf die Bewegungsrichtung der Punkte zu konzentrieren. Anschließend wurden sie nach den Bewegungsrichtungen der Kinematogramme beider Gesichtshälften befragt. Dabei zeigte sich, dass während Phasen hoher Alphaaktivität die Bewegungsrichtung des Kinematogrammes der nicht beachteten Seite nicht erkannt wurde. Darüber hinaus demonstrierten die Autoren, dass allgemein in den okzipitalen Arealen kontralateral zur nicht beachteten Gesichtshälfte die Alphaaktivität anstieg, was für eine Inhibition der nicht beachteten Seite spricht. Im Einklang mit der *alpha inhibition theory* (Klimesch et al., 2007) stehen starke Alpha-Oszillationen für eine Inhibition und Abkopplung von Task irrelevanten Arealen, während eine sehr geringe Alphaaktivität eine Signatur für ein beschäftigtes Areal ist, das aktiv neuronal prozessiert. Während der Prozessierung visueller Informationen nehmen die okzipitalen Alpha-Oszillationen ab (Aranibar and Pfurtscheller, 1978), wohingegen die Alpha-Oszillationen im visuellen Kortex während der Bewegungsplanung und Ausführung (Toro et al., 1994, Pfurtscheller et al., 2000) und während der Prozessierung auditorischer Stimuli zunehmen (Lehtela et al., 1997). In Erwartung eines auditorischen Stimulus ist die Alphaaktivität im visuellen Kortex erhöht, im Vergleich zur Erwartungshaltung, dass ein visueller Stimulus dargeboten wird (Foxe et al., 1998, Fu et al., 2001). Weitere Studien haben demonstriert, dass die Alphaaktivität kontralateral zu der Hemisphäre, in der ein Stimulus erwartet wird, ansteigt (Worden et al., 2000, Yamagishi et al., 2003, Kelly et al., 2006). Die Modulationen der Alphaaktivität sind sowohl im ventralen als auch im dorsalen Pfad nachweisbar. In Erwartungshaltung auf einen bewegten Stimulus erhöht sich die Alphaaktivität in den ventralen Arealen und umgekehrt, in Erwartungshaltung eines farbigen Objektes erhöht sich die Alphaaktivität in den dorsalen Arealen (Snyder and Foxe, 2010). All dies sind Hinweise dafür, dass an der Prozessierung nicht beteiligte Areale durch Alphaoszillationen inhibiert werden. Des Weiteren scheint über die Modulation der Alphaaktivität ein antizipatorischer Mechanismus vermittelt zu werden, über den Areale schon im Vorfeld deaktiviert werden, wenn diese für die zu erwartende Aufgabe mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht benötigt werden.

7.7 Alpha-Oszillationen und Inhibition

Es drängt sich nun die Frage auf, wie es durch Modulationen der Alphaaktivität zur Inhibition eines ganzen Areals kommen kann. Basierend auf dem Modell der *active inhibition* (Klimesch et al., 2007) wurde die Hypothese entwickelt (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013), dass die Fluktuationen im Alphaband direkt die Erregbarkeit der kortikalen Neurone reflektiert. Die Hypothese basiert auf Studien und Ergebnissen, die nachfolgend vorgestellt werden. Aktivitätsveränderungen innerhalb eines Areals können nicht nur auf die physikalischen Eigenschaften eines Stimulus zurückgeführt werden, sondern können auch ohne visuelle oder auditorische Stimulation durch *top-down* Prozesse vermittelt werden. In einer Studie mit schizophrenen Patienten konnte gezeigt werden, dass bei auditorischen Halluzinationen auch der auditorische Kortex aktiv ist (Dierks et al., 1999). Aktivitätsveränderungen innerhalb eines Areals erfolgen auch schon durch Fokussierung der Aufmerksamkeit. Richtet man seine Aufmerksamkeit auf eine bestimmte Position im Raum, erhöht sich im für diese Position entsprechenden Bereich des visuellen Kortex die Aktivität. Nachgewiesen wurde dies zum einen durch Einzelzelleableitungen (Luck et al., 1997) und räumlich hoch aufgelöst durch fMRI (Kastner et al., 1999, Muller and Kleinschmidt, 2003). Zurückzuführen sind diese Veränderungen auf Modulationen innerhalb der Baselineaktivität, sie erfolgen ohne visuelle Stimulation und werden durch *top-down* Prozesse getragen (Luck et al., 1997, Kastner et al., 1999, Hopfinger et al., 2000, Giesbrecht et al., 2006). Diese Veränderungen der Baselineaktivität treten beim Menschen innerhalb des Alphabandes auf und es wird vermutet, dass sie den Grad der kortikalen Erregung reflektieren (Pfurtscheller, 2001).

Pfurtscheller definiert drei Stadien der kortikalen Prozessierung:

1. Neutraler Modus („resting state“): Es erfolgt keine Prozessierung von sensorischen, motorischen oder kognitiven Vorgängen
2. Aktivierter Modus: Er ist charakterisiert durch eine erhöhte Prozessierung von Informationen innerhalb eines spezifischen Netzwerks und einer erhöhten Erregbarkeit kortikaler Neurone. Identifiziert werden kann dieser Zustand anhand asynchroner und somit geringer Aktivität im Alpha- und niederfrequenten Beta-Band. Im Sinne der Informationstheorie ist dieser Modus der Zustand maximaler Aufnahmefähigkeit von Informationen (Thatcher et al., 1983).

3. Deaktivierter Zustand: Er ist charakterisiert durch eine reduzierte Informationsprozessierung in einem spezifischen Netzwerk und einer reduzierten Erregbarkeit kortikaler Neurone. Identifiziert werden kann dieser Zustand anhand synchroner und somit erhöhter Aktivität im Alpha- und niederfrequenten Beta-Band. Im EEG sind große Amplituden für diesen Zustand charakteristisch.

Basierend auf der Einteilung von Pfurtscheller entwickelte sich in den folgenden Jahren die Hypothese der *functional inhibition*, die besagt, dass anhand der Alphaspower innerhalb eines Areals die Erregbarkeit der Neurone abgelesen werden kann (Pfurtscheller, 2001, Klimesch et al., 2007). Bislang gab es keine direkten Nachweise dafür, dass z.B. bei erhöhter Alphaspower im visuellen Kortex die Erregbarkeit der Neurone reduziert ist. Einen indirekten Nachweis für die Hypothese liefern die fMRI Studien von Scheringa und Kleinschmidt (Scheeringa et al., 2011, Scheeringa et al., 2012). Sie konnten zeigen, dass die visuell evozierte Antwort auf einen Stimulus geringer ist, wenn der dargebotene Stimulus auf den Scheitelpunkt einer Alphawelle trifft. Sie zogen daraus den Schluss, dass Alpha-Oszillationen periodisch die Erregbarkeit kortikaler Neurone widerspiegeln. Der in der Literatur bislang am häufigsten zitierte Nachweis der Hypothese basiert auf den Studien von Vincenzo Romei und Gregor Thut (Thut et al., 2006, Romei et al., 2008a, Romei et al., 2008b). In einer ihrer Studien (Romei et al., 2008a) wurden Probanden mit verbundenen Augen mittels transkranieller Magnetimpulse (TMS) stimuliert. Durch TMS wurden illusorische visuelle Empfindungen erzeugt, die man als Phosphene bezeichnet. Sie konnten nachweisen, dass die Phosphenillusion in Phasen hoher Alphaaktivität im visuellen Kortex ausblieb. In Phasen geringer Alphaaktivität hingegen konnten diese induzierten Illusionen festgestellt werden. Sie schlossen daraus, dass in Phasen hoher Alphaaktivität im visuellen Kortex die Erregbarkeit der Neurone so stark reduziert ist, dass die transkraniale magnetische Stimulation nicht ausreichte, um die Zellen zu depolarisieren und somit einen illusorischen Effekt zu erzeugen. In einer Folgestudie induzierte die Arbeitsgruppe durch TMS-Impulse direkt einen Alphasrhythmus während der Stimulation, und es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Detektion eines Stimulus schlechter wurde (Romei et al., 2010). Auch dieser Nachweis bestätigt die Hypothese, dass der Alphasrhythmus die Erregbarkeit der kortikalen Neurone beeinflusst - wenn auch nur indirekt.

Wie in Ergebnisteil beschrieben, kann mit Hilfe spannungsabhängiger Farbstoffe direkt nachgewiesen werden, dass in Phasen geringer Erregbarkeit der Neurone im visuellen Kortex die Alphaaktivität signifikant erhöht ist. Meine Daten liefern somit eine direkte Bestätigung der Arbeitshypothese aus früheren Studien (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013). Diese globale Erhöhung kann hier aufgrund der VSD-Ableitungen

in deutlich höherer Auflösung als in MEG oder EEG Studien nachgewiesen werden. Mit Hilfe des VSD Imagings konnte die Alphaaktivität im visuellen Kortex räumlich hoch aufgelöst visualisiert werden, ein Pixel umfasst eine Kortexoberfläche von $64 \times 64 \mu\text{m}$. Die räumliche Auflösung aller MEG und EEG Studien auf dem Gebiet der Alphaaktivität ist deutlich geringer, da die Auflösung dieser Methoden höher als $2000 \times 2000 \mu\text{m}$ pro Pixel ist.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das Maß an Spontanaktivität die Antwortstärke auf den Stimulus beeinflusst (Arieli et al., 1996). Die Modulationen der Spontanaktivität hängen wiederum mit Modulationen in der Alphaaktivität zusammen. Die Alphaaktivität moduliert die Perzeption (Ergenoglu et al., 2004, Thut et al., 2006, Romei et al., 2008a, van Dijk et al., 2008, Mathewson et al., 2009) und reflektiert die Erregbarkeit des entsprechenden Netzwerks (Romei et al., 2008a, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013).

7.8 Modelle zur Modulation der kortikalen Erregbarkeit im Alpharhythmus

Abschließend stellt sich die Frage, durch welche kortikalen Mechanismen die Alphaaktivität die Erregung von Neuronen beeinflussen kann.

Jones hat ein Modell vorgestellt, wie die funktionelle Inhibition des visuellen Pfades vermittelt werden könnte (Jones et al., 2000). In diesem Modell sind exzitatorische und inhibitorische Neurone gegenseitig miteinander synaptisch verbunden (*Abbildung 52*). Während eines Alpha-Zyklus feuern inhibitorische Neurone, was zu einer GABAergen Inhibition der exzitatorischen Neurone führt. Die exzitatorischen Neurone werden hyperpolarisiert, sind durch eine starke Erregung aber noch in der Lage zu depolarisieren und zu feuern. Da der visuelle Fluss von Informationen nicht versiegt, werden diese Neurone erregt. Ist die Erregung stark genug, feuern sie trotz des inhibitorischen Einflusses der durch den Alphazyklus aktivierten Interneurone. Die exzitatorischen Neurone bilden in diesem Modell rückgekoppelt Synapsen mit den Interneuronen (*rebound excitation*). Feuern die exzitatorischen Neurone, aktivieren sie die Interneurone, deren Feuerrate nun ansteigt und die exzitatorischen Neurone GABAerg noch stärker hemmen. Die Hyperpolarisation der exzitatorischen Neurone steigt an, wodurch die Erregbarkeit sinkt. Durch diese rückgekoppelte neuronale Schleife könnte die Erregbarkeit in einem Areal reduziert werden.

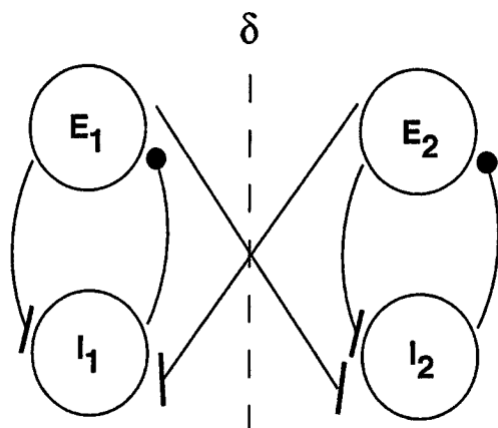


Abbildung 52: Modell der funktionellen Inhibition des visuellen Pfades

Die Abbildung zeigt das von Stephanie R. Jones (Jones et al., 2000) vorgeschlagene Modell zur funktionellen Inhibition des visuellen Pfades. Die exzitatorischen Neurone bilden in diesem Modell rückgekoppelt Synapsen mit den Interneuronen (rebound excitation). Eine visuell induzierte Erregung der exzitatorischen Neurone führt gleichzeitig zu einer Aktivierung der inhibitorischen Interneurone im Netzwerk, welche wiederum die exzitatorischen Neurone hemmen. Obwohl der visuelle Fluss von Informationen nicht versiegt, wird die Erregbarkeit der exzitatorischen Neurone im Netzwerk nach und nach reduziert. Nach diesem Modell kann die Aktivität der Interneurone durch Modulation der Alphaaktivität beeinflusst werden. Durch diese Modulationen wiederum könnte die Erregbarkeit eines Areals gesteuert werden.

Basierend auf der Idee von Jones wurde das Modell der *pulsed inhibition* entwickelt (Mathewson et al., 2009, Jensen and Mazaheri, 2010, Mathewson et al., 2011, Mathewson et al., 2012). Das Modell besagt, dass GABAerge Interneurone im Alpharhythmus die pyramidalen Neurone in Schicht II und II phasisch inhibieren. Die Alphaamplitude reflektiert die synchrone Inhibition durch die GABAergen Interneurone. Je höher die Amplitude, desto höher ist die synchrone Feuerrate der Interneurone und somit die Inhibition (Abbildung 53).

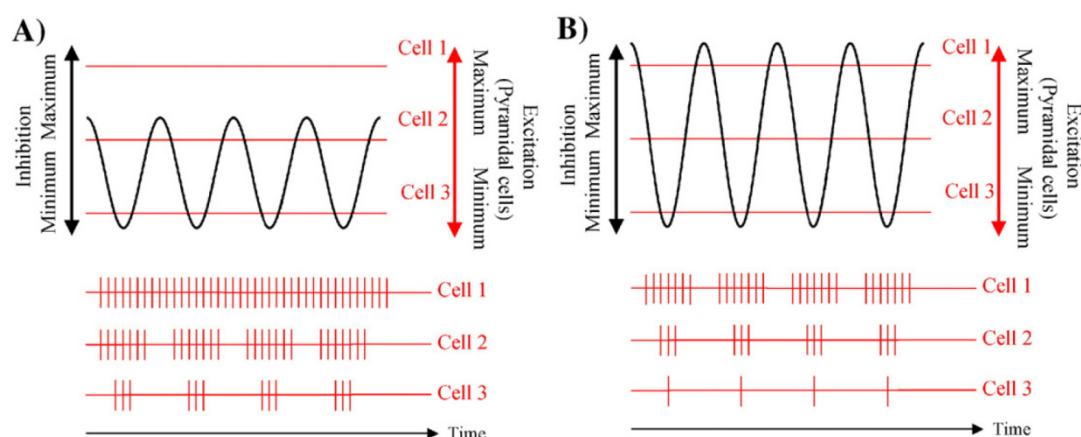


Abbildung 53 :Die „alpha inhibition“ Theorie

Schematische Darstellung der „alpha inhibition“-Theorie (Klimesch et al., 2007). Die Erregbarkeit der Zellen wird phasisch in Abhängigkeit von der oszillatorischen Power im Alphaband moduliert. Während Phasen niedriger Alphaamplituden (a) werden die Zellen weniger inhibiert. Während Phasen hoher Alphaaktivität (b) hingegen erfolgt auch eine stärkere Inhibition (Klimesch et al., 2007).

In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass in Abhängigkeit von der Alphanpower nicht nur die Erregbarkeit sondern auch die Aktivität im Gamma-Band moduliert wird (*Abbildung 54* - (Osipova et al., 2008)). Die Aktivität im Gamma-Band korreliert mit der Stärke von optischen Karten (Niessing et al., 2005), was wiederum die Variabilität der Imaging Daten erklären könnte. In Phasen hoher Alphaaktivität ist aufgrund der geringen Erregbarkeit die Spontanaktivität gering und die Aktivität im Gamma-Band erniedrigt, was schlussendlich beides zu optischen Karten mit geringer Amplitude führt. Während Phasen geringer Alphaaktivität verhält sich dieser Mechanismus entgegengesetzt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Laminarelektroden nachgewiesen werden, dass die oszillatorische Aktivität im Alpha- und Gamma-Band innerhalb einer Kolumne des primären visuellen Kortex antikorreliert ist. Während Phasen von hoher Alphaaktivität in den tiefen Schichten ist die Aktivität im Gamma-Band in den Schichten II und III gering (Spaak et al., 2012). Die Studie untermauert die Hypothese, dass während Phasen von hoher Alphaaktivität die mittels VSDI visualisierte kortikale Aktivität geringer ist. Das Signal des Farbstoffs reflektiert hauptsächlich die Aktivität großer pyramidalen Neurone in Schicht II und III (Grinvald, 1999, Petersen et al., 2003). Die hohe Trial-to-Trial Variabilität in meinen optischen Daten könnte mit diesem Mechanismus, in Abhängigkeit von der Alphaaktivität in den tiefen Schichten des primären visuellen Kortex, erklärt werden.

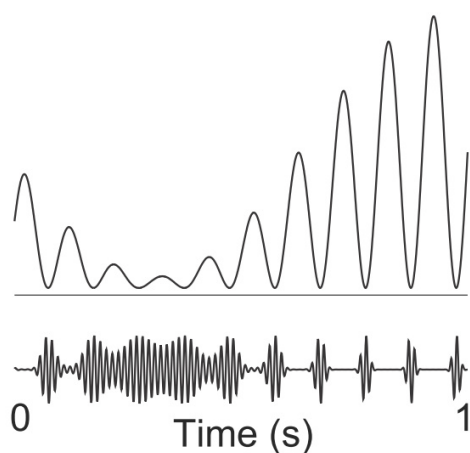


Abbildung 54: Simultane Darstellung der Aktivität im Alpha- und Gamma-Band

Schematische simultane Darstellung der oszillatorischen Aktivität im Alphaband (a) und im Gamma-Band (b). In Abhängigkeit von der Alphanpower wird die Aktivität im Gamma-Band moduliert (Osipova et al., 2008).

Grundsätzlich gilt es aber auch noch zu klären, welche Zentren im Gehirn den Alpharhythmus überhaupt initiieren. Die Inhibition des primären visuellen Kortex durch hohe Alphaaktivität wurde diskutiert, aber wo ist der Ursprung dieser Wellen? Mögliche Quellen sind zum einen der Thalamus, der über ein Schrittmacherzentrum verfügt, das rhythmisch

bei 10 Hz feuert und so ein Netzwerk aus inhibitorischen Zellen stimuliert (Lorincz et al., 2009). Andere Quellen könnten kortikale Areale höherer Ordnung sein, die über *feedback* Verbindungen die Aktivität in hierarchisch niedrigeren Arealen modulieren können. Der Einfluss hierarchisch höherer Areale auf den primären visuellen Kortex wird nachfolgend diskutiert.

7.9 Einfluss höherer Areale auf die Aktivität in Area 18

Die visuelle Perzeption kann durch *top-down* Modulationen ausgehend von hierarchisch höheren Arealen beeinflusst werden (Gilbert and Sigman, 2007, Gilbert and Li, 2013). In Studien an Makaken wurde nachgewiesen, dass kortikale *feedback* Verbindungen wichtig sind für die Perzeption von Stimuli niedriger Salienz und die Diskriminierung von bewegten Objekten vor dem Hintergrund (Hupe et al., 1998, Bullier et al., 2001). Der MS-Kortex ist die dominierende Struktur zur Analyse von Bewegungen im extrastriaten Kortex der Katze. 26% aller Efferenzen von Area 18 stammen aus dem MS-Kortex (Payne and Lomber, 2003). Durch die thermische oder pharmakologische Deaktivierung von PMLS konnte gezeigt werden, dass die Neurone in Area 18 (Galuske et al., 2002) und in Area 17 (Shen et al., 2006) ihre Richtungsselektivität verloren, wohingegen die Orientierungsselektivität weitestgehend erhalten blieb. Da der PMLS-Kortex in der Lage ist, die Antworteigenschaften der Neurone in Area 18 zu modulieren, könnte auch er Teil des Netzwerks sein, das für die Trial-to-Trial Variabilität verantwortlich ist.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Schwankungen in Area 18 auch in hierarchisch höheren Arealen zu erkennen sind, wurde der PMLS Kortex simultan zu Area 18 elektrophysiologisch abgeleitet. Wie in Ergebnisteil dargestellt, ist in Phasen hoher Spontanaktivität in Area 18 auch die spontane Feuerrate in PMLS signifikant erhöht. Auch in Bezug auf die spontanen oszillatorischen Schwankungen verhält sich der PMLS Kortex analog zu Area 18. In Phasen geringer Spontanaktivität ist die Alhaphower nicht nur in Area 18, sondern auch in PMLS signifikant erhöht. Da sich in Bezug auf die Spontanaktivität und die spontanen Oszillationen Area 18 und PMLS gleich verhalten, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass beide Areale entweder miteinander kommunizieren oder von einem dritten unbekannten Areal parallel aktiviert werden (z.B. Pulvinar). Um eine mögliche Kommunikation zu verifizieren, wurde die Alphaaktivität in beiden Arealen innerhalb Phasen hoher und geringer Spontanaktivität miteinander korreliert. Während Phasen geringer Spontan- und somit starker Alphaaktivität ist die Korrelation zwischen beiden Arealen doppelt so hoch (Korrelation= 0.61; $R^2 = 0.37$), verglichen mit Phasen hoher Spontanaktivität (Korrelation= 0.36; $R^2 = 0.13$). Eine hohe Korrelation der beiden Areale ist aber noch kein eindeutiger Beweis für eine Interaktion.

7.10 Ursprung der Interaktionen im Alphaband

Um eine mögliche Interaktion zwischen PMLS und Area 18 nachzuweisen, wurde eine Kohärenzanalyse durchgeführt. Die Kohärenz ist ein Maß für die Synchronität zwischen neuronalen Netzwerken. Eine Kohärenz von 1 bedeutet, dass die Phasen zweier neuronaler Populationen identisch sind und sie somit synchron oszillieren. Eine hohe Kohärenz ermöglicht eine effektive Kommunikation zwischen zwei neuronalen Gruppen (Fries, 2005). Aktive Neurone haben die intrinsische Eigenschaft zu oszillieren, und diese Oszillationen erzeugen rhythmische Modulationen der Erregbarkeit, was sowohl die Generierung von Aktionspotentialen als auch den synaptischen Input beeinflusst (Buzsaki and Draguhn, 2004). Dadurch entstehen zeitliche Fenster für eine Kommunikation. Nur kohärent oszillierende Populationen von Neuronen können effektiv miteinander kommunizieren, da die zeitlichen Fenster für In- und Output gleichzeitig offen sind (Fries, 2005). In Phasen hoher Alphaaktivität ist die Kohärenz im mittleren Alphaband zwischen Area 18 und PMLS > 0.5 , was auf eine effektive Kommunikation zwischen beiden Arealen schließen lässt. Die Kohärenz ist in diesem Fall um 22 % höher als in Phasen geringer Alphaaktivität. Im Sinne der Alpha-Inhibitions-Theorie nach Klimesch (Klimesch et al., 2007) können durch Modulationen der Alphaaktivität gezielt Areale unter Herabsenkung der Erregbarkeit inhibiert werden (Romei et al., 2008a, Jensen and Mazaheri, 2010, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013). Nach dieser Theorie könnte während Phasen hoher Kohärenz im Alphaband über *feedforward* Verbindungen entweder PMLS durch Area 18 inhibiert werden oder aber Area 18 über *feedback* Verbindungen durch PMLS. Um zu überprüfen, von welcher Quelle die starken Alphaoszillationen ausgehen, wurde über den Phasenverschiebungswinkel Φ ermittelt, ob die Oszillationen von PMLS oder Area 18 ausgehen. Wie im Ergebnisteil beschrieben, ist die Phase um 12 ms verschoben und geht von PMLS aus. In der Literatur variieren die Zeitangaben zu den Latenzen zwischen PMLS und Area 18. Die Leitgeschwindigkeit der Axone von *feedforward*- und *feedback* Verbindungen im visuellen Kortex ist annähernd gleich (Nowak et al., 1997, Lamme et al., 1998). Unter Einbeziehung der axonalen Leitgeschwindigkeit und der Verzögerung durch die synaptische Übertragung lässt sich eine theoretische Latenz zwischen PMLS und Area 18 von 5-15 ms berechnen (Dinse and Kruger, 1994). Die *in vivo* gemessenen Werte schwanken zwischen 3,3 und 26,3 ms (Dinse and Kruger, 1994, Vajda et al., 2004). Die in dieser Arbeit ermittelte Latenz von 12 ms zwischen PMLS und Area 18 lässt sich somit literarisch gut einordnen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine *top-down* gesteuerte Modulation der Erregbarkeit durch Alpha.

7.11 Top-down gesteuerte Modulationen im interarealen Kontext

Modulationen der Erregbarkeit, die von hierarchisch höheren Arealen auf hierarchisch niedrigere Areale weitergegeben werden, sind bereits im Zusammenhang der selektiven Aufmerksamkeitssteuerung diskutiert worden (Luck et al., 1997, Kastner et al., 1999, Muller and Kleinschmidt, 2003, Handel et al., 2011). In diesem Kontext wurde dem Alpha-Band eine besondere Rolle zugeschrieben (Romei et al., 2008a, Jensen and Mazaheri, 2010, Romei et al., 2010, Lange et al., 2013). FMRI Studien haben gezeigt, dass in Phasen erhöhter Aufmerksamkeit Bereiche im superioren frontalen, im inferioren parietalen und superioren temporalen Kortex aktiv sind (Hopfinger et al., 2000). Während sich frontal (FEF, SEF) und parietal (SPL, IPL) die Aktivität erhöht, nimmt auch die spontane Aktivität in der Baseline in den visuellen Arealen zu (Kastner et al., 1999). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass Aufmerksamkeit vermutlich *top-down* gesteuert ist und die Sensitivität der frühen visuellen Areale moduliert (Kastner et al., 1999, Hopfinger et al., 2000, Corbetta and Shulman, 2002). Durch Fokussierung der Aufmerksamkeit erhöht sich die neuronale Feuerrate auf einen Stimulus (Reynolds et al., 2000, Fries et al., 2001b), und die Synchronisation im Gamma-Band steigt während die Synchronisation in den niederen Frequenzen sinkt (Fries et al., 2001b, Womelsdorf et al., 2006). Die durch Aufmerksamkeit hervorgerufene erhöhte Sensitivität der frühen visuellen Areale lässt sich über Modulationen im Alphaband erklären. Durch die Fokussierung der Aufmerksamkeit sinkt die Alphaaktivität in den entsprechenden Arealen (Sauseng et al., 2005, Thut et al., 2006). Die selektive Aufmerksamkeit in einem Hemifeld erniedrigt die Alphapower im kontralateralen visuellen Kortex, während in der nicht beachteten Hemisphäre ipsilateral die Alphaaktivität steigt (Sauseng et al., 2005). Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass nicht benötigte Areale durch eine hohe Aktivität im Alphaband inhibiert werden (Pfurtscheller, 2001, Klimesch et al., 2007), wohingegen die Alphaaktivität in aktiven Arealen abnimmt. Die Reduktion der Alpha-Aktivität während der Antizipation ist ein wichtiger Prozess, wie eine aktuelle Studie von Capotosto und Corbetta zeigt (Capotosto et al., 2009). Sie vertreten die Hypothese, dass es für die Kontrolle der räumlichen Aufmerksamkeit eine dorsales, frontoparietales Netzwerk gibt, das die Regionen des intraparietalen Sulkus (IPS) und der Region des frontalen Augenfeldes (FEF) beinhaltet (Kastner and Ungerleider, 2000, Corbetta and Shulman, 2002, Serences and Yantis, 2006). Ohne Stimulation ist in den frontoparietalen und den visuellen, okzipitalen Arealen die Alphapower hoch (Steriade and Llinas, 1988) und in der Antizipationsphase in Erwartung visueller Stimuli hingegen reduziert (Klimesch et al., 1998). Stört man die antizipatorische Aktivität in FEF und IPS durch TMS (Interferenz), wird die Reduktion der Alphaaktivität verhindert (Capotosto et al., 2009). Die *top-down* Interaktion von frontoparietalen Regionen und dem visuellen okzipitalen Arealen in der Erwartungsphase ist beeinträchtigt. Ohne die

Reduktion der Alphaoszillationen ist die Erregbarkeit der Neurone in den visuellen Arealen zu stark verringert, wodurch Defizite in der Detektion des Stimulus entstehen können. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Hanslmayr gestützt, in welcher gezeigt wurde, dass ein hohes frontoparietales Phasecoupling im Alphabereich die Perzeption inhibiert (Hanslmayr et al., 2007). Übertragen auf meine Ergebnisse kann ich den gleichen Effekt im Kortex der Katze zeigen. Eine hohe Kohärenz und somit gleichbedeutend ein hohes Phasecoupling im Alphabereich zwischen PMLS und Area 18 erniedrigt die Antwortstärke auf einen visuellen Stimulus.

7.12 Thalamo-kortikale Netzwerke und Aufmerksamkeit

Die Ergebnisse von Capotosto (Capotosto et al., 2009), Hanslmayr (Hanslmayr et al., 2007) und vanDijk (van Dijk et al., 2008) sprechen für eine *top-down* gesteuerte Modulation der Spontanaktivität in den primären visuellen Arealen über Modulationen der Alphaaktivität. Dieser Hypothese steht entgegen, dass der Thalamus das Kontrollorgan ist und entscheidet, welche Informationen den Kortex erreichen (Pfurtscheller, 2003, Lorincz et al., 2009). Aus anatomischer Sicht ist die Lage des Thalamus ideal, die Weiterleitung von Informationen zum Kortex zu kontrollieren (Singer, 1977, Crick, 1984, Sherman and Koch, 1986). Der CGL ist die hierarchisch niedrigste Struktur im visuellen System, welche modulatorisch die visuelle Perzeption beeinflussen kann. Neben dem CGL hat auch der Pulvinar stark ausgeprägte reziproke Verbindungen zum Kortex (Saalmann and Kastner, 2011). Eine aktuelle Studie von Casagrande hat gezeigt, dass durch die reversible Deaktivierung vom Pulvinar supragranuläre Neurone in V1 nicht mehr in der Lage waren, auf einen Stimulus zu antworten, während durch die Stimulation vom Pulvinar die Antwortstärke auf den Stimulus erhöht wird. Nach Casagrande und Purushothaman ist der Pulvinar in der Lage, den Fluss von Informationen zu V1 und höheren Arealen zu kontrollieren und zu blockieren (Purushothaman et al., 2012). Lorincz und Kollegen identifizierten ein Netzwerk von thalamokortikalen Neuronen, welches phasisch im Alpharhythmus die Weiterleitung zum Kortex blockierte (Lorincz et al., 2009). Steriade identifizierte ein Schrittmacherzentrum im TRN, welches die intrinsische Eigenschaft aufweist, im 7-15 Hz Rhythmus zu oszillieren (Steriade et al., 1987, Steriade et al., 1993). In diesem Zustand sind die Zellen hyperpolarisiert und die Weiterleitung durch den Thalamus zum Kortex ist blockiert (Pfurtscheller, 2003).

Bislang ist nicht geklärt, ob nun der Thalamus oder die *top-down* Einflüsse das Kontrollorgan der visuellen Pfade sind. Aber beide Theorien könnten auch parallel existieren! Bislang galt als bewiesen, dass durch selektive Aufmerksamkeit die Neurone im visuellen Kortex, nicht aber im Thalamus beeinflusst werden (Lehky and Maunsell, 1996, Mehta et al., 2000,

Bender and Youakim, 2001). Die Sichtweise hat sich durch aktuelle Ergebnisse geändert, da in Human- und Makaken-Experimenten gezeigt werden konnte, dass auch die Aktivitäten im CGL und somit die Perzeption durch Fokussierung der Aufmerksamkeit moduliert werden können (O'Connor et al., 2002, McAlonan et al., 2006, 2008). Wenn das Gehirn nun in einem Modus erhöhter Wach- und Aufmerksamkeit übergeht, könnte parallel über *feedback* Verbindungen *top-down* und *feedforward* über den Thalamus die Alphaaktivität herunterreguliert und die Erregbarkeit der Neurone im visuellen Kortex gesteigert werden.

7.13 Synthese und Ausblick

Dem PMLS-Kortex der Katze könnte nach dieser Hypothese dank seiner Konnektivität eine entscheidende Rolle zukommen. *Top-down* initiiert könnte PMLS als Teil des Netzwerks über die zahlreichen *feedback* Verbindungen die neuronale Aktivität in Area 18 effektiv modulieren. Der PMLS Kortex unterhält aber auch stark ausgeprägte Verbindungen zum Thalamus (Payne and Lomber, 2003), der wiederum dazu in der Lage ist, die Weitergabe von visuellen Informationen nach V1 zu kontrollieren (Purushothaman et al., 2012). Die dualen und somit sehr effektiven Modulationen der Aktivitäten in V1 durch *top-down* Verbindungen und den Thalamus könnten umgesetzt werden über PMLS als zentrale Schaltstelle.

Über die anatomischen Verbindungsmuster dieses Netzwerks in der Katze ist dazu bislang noch wenig bekannt. Wie schon zuvor beschrieben ist der PMLS Kortex der Katze homolog zu MT von Makaken (Payne, 1993). MT wiederum erhält Efferenzen von FEF (Felleman and Van Essen, 1991), einem der Areale, welches *top-down* über Modulation der Alphaaktivität Einfluss auf den visuellen Kortex nimmt (Capotosto et al., 2009). Da die Katze homolog zum Makaken auch ein frontales Augenfeld besitzt (Guitton and Mandl, 1974, Tsumoto and Suzuki, 1976, Meredith, 1999, McHaffie et al., 2001), könnte anatomisch die *top-down* Modulation entsprechend verlaufen (*Abbildung 55*).

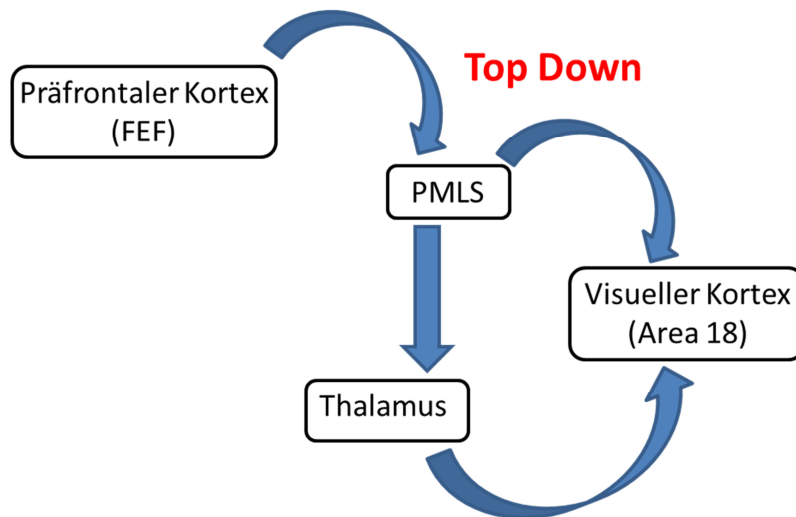


Abbildung 55: Top-down gesteuerte Modulation der Aktivität im visuellen Kortex

Schematische Darstellung der hypothetischen aufmerksamkeitsabhängigen top-down gesteuerten Modulation der Aktivität im visuellen Kortex. Initiiert über feedback Verbindungen aus dem präfrontalen Kortex könnte der PMLS-Kortex direkt oder indirekt über den Thalamus dank seiner ausgeprägten Konnektivität die Aktivität in Area 18 modulieren.

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, sollten in zukünftigen Experimenten neben Area 18 und PMLS auch präfrontale Areale elektrophysiologisch abgeleitet werden. In Akutexperimenten könnte über eine Kohärenzanalyse zunächst geklärt werden, ob es eine Kommunikation zwischen den drei Arealen gibt. In wie weit es analog zum Makaken ein frontoparietales Aufmerksamkeitssystem gibt, das *top-down* über die Modulationen von Alpha die Erregbarkeit der Neurone in Area 18 und somit die Perzeption beeinflusst, könnte anschließend durch chronische elektrophysiologische Ableitungen im wachen Tier überprüft werden.

Basierend auf den Ergebnissen meiner Arbeit empfehle ich für zukünftige Studien die Datenanalyse auf Single Trial Niveau grundlegend zu verändern. Der klassische experimentelle Ansatz ist der Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen zwei oder mehr Versuchsbedingungen. Die resultierenden Unterschiede in der neuronalen Aktivität werden dabei anschließend auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückgeführt. Meine Ergebnisse liefern den Hinweis, dass neben den experimentellen Konditionen auch die Spontanaktivität die neuronale Aktivität verändern kann. Daher sollten in Zukunft neben der klassischen Analyse die Daten parallel dazu in individuelle Testgruppen mit hoher und geringer Spontan- oder Alphaaktivität aufgeteilt werden. Die resultierenden Ergebnisse können anschließend miteinander verglichen werden. Der Experimentator kann so die Gewissheit erlangen, dass die beobachteten Effekte in den Ergebnissen auf die von ihm erwählten spezifischen Versuchsbedingungen und nicht auf Modulationen innerhalb der neuronalen Spontanaktivität zurückzuführen sind.

8 Literaturverzeichnis

- Adams MM, Hof PR, Gattass R, Webster MJ, Ungerleider LG (2000) Visual cortical projections and chemoarchitecture of macaque monkey pulvinar. *The Journal of comparative neurology* 419:377-393.
- Adrian E, Matthews B (1934) The Berger rhythm: potential changes from the occipital lobes in man. *Brain* 57:355-385.
- Amit DJ, Brunel N (1997) Model of global spontaneous activity and local structured activity during delay periods in the cerebral cortex. *Cerebral cortex* 7:237-252.
- Anderson JC, Binzegger T, Martin KA, Rockland KS (1998) The connection from cortical area V1 to V5: a light and electron microscopic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:10525-10540.
- ANDOR (2009) Making Sense of Sensitivity ANDOR Technology Ltd, Belfast, Northern Ireland.
- Angelucci A, Levitt JB, Walton EJ, Hupe JM, Bullier J, Lund JS (2002) Circuits for local and global signal integration in primary visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:8633-8646.
- Aranibar A, Pfurtscheller G (1978) On and off effects in the background EEG activity during one-second photic stimulation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 44:307-316.
- Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A (1996) Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* 273:1868-1871.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2008) *Neurowissenschaften - Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie* (3. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag.
- Bender DB (1982) Receptive-field properties of neurons in the macaque inferior pulvinar. *Journal of neurophysiology* 48:1-17.
- Bender DB, Youakim M (2001) Effect of attentive fixation in macaque thalamus and cortex. *Journal of neurophysiology* 85:219-234.
- Berger H (1929) Über das Elektroenkephalogramm des Menschen. *Arch Psychiatr Nervenkr* 87:527-570.
- Bokil H, Andrews P, Kulkarni JE, Mehta S, Mitra PP (2010) Chronux: a platform for analyzing neural signals. *Journal of neuroscience methods* 192:146-151.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1993) The layout of iso-orientation domains in area 18 of cat visual cortex: optical imaging reveals a pinwheel-like organization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:4157-4180.
- Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Hans Huber, Bern.
- Bullier J, Hupe JM, James AC, Girard P (2001) The role of feedback connections in shaping the responses of visual cortical neurons. *Progress in brain research* 134:193-204.
- Burke W, Dreher B, Wang C (1998) Selective block of conduction in Y optic nerve fibres: significance for the concept of parallel processing. *The European journal of neuroscience* 10:8-19.
- Buzsaki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.
- Callaway EM (2005) Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. *The Journal of physiology* 566:13-19.
- Capotosto P, Babiloni C, Romani GL, Corbetta M (2009) Frontoparietal cortex controls spatial attention through modulation of anticipatory alpha rhythms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:5863-5872.
- Chalupa LM, Coyle RS, Lindsley DB (1976) Effect of pulvinar lesions on visual pattern discrimination in monkeys. *Journal of neurophysiology* 39:354-369.
- Cleland BG, Levick WR, Wassle H (1975) Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells. *The Journal of physiology* 248:151-171.
- Cohen LB, Keynes RD, Hille B (1968) Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature* 218:438-441.

- Corbetta M, Shulman GL (2002) Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 3:201-215.
- Crick F (1984) Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:4586-4590.
- Deschenes M, Roy JP, Steriade M (1982) Thalamic bursting mechanism: an inward slow current revealed by membrane hyperpolarization. *Brain research* 239:289-293.
- Dierks T, Linden DE, Jandl M, Formisano E, Goebel R, Lanfermann H, Singer W (1999) Activation of Heschl's gyrus during auditory hallucinations. *Neuron* 22:615-621.
- Dinse HR, Kruger K (1994) The timing of processing along the visual pathway in the cat. *Neuroreport* 5:893-897.
- Elston GN, Rosa MG (1997) The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer III of functionally related cortical visual areas. *Cerebral cortex* 7:432-452.
- Ergenoglu T, Demiralp T, Bayraktaroglu Z, Ergen M, Beydagi H, Uresin Y (2004) Alpha rhythm of the EEG modulates visual detection performance in humans. *Brain research Cognitive brain research* 20:376-383.
- Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral cortex* 1:1-47.
- Foxe JJ, Simpson GV, Ahlfors SP (1998) Parieto-occipital approximately 10 Hz activity reflects anticipatory state of visual attention mechanisms. *Neuroreport* 9:3929-3933.
- Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in cognitive sciences* 9:474-480.
- Fries P, Neuenschwander S, Engel AK, Goebel R, Singer W (2001a) Rapid feature selective neuronal synchronization through correlated latency shifting. *Nature neuroscience* 4:194-200.
- Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R (2001b) Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291:1560-1563.
- Fu KM, Foxe JJ, Murray MM, Higgins BA, Javitt DC, Schroeder CE (2001) Attention-dependent suppression of distracter visual input can be cross-modally cued as indexed by anticipatory parieto-occipital alpha-band oscillations. *Brain research Cognitive brain research* 12:145-152.
- Galuske RA, Schmidt KE, Goebel R, Lomber SG, Payne BR (2002) The role of feedback in shaping neural representations in cat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:17083-17088.
- Garey LJ, Dreher B, Robinson SR (1991) The Organization of the Visual Thalamus. In: *Vision and Visual Dysfunction Vol3: Neuroanatomy of the Visual Pathways and their Development* Houndmills: Macmillan Press, 176-234.
- Giesbrecht B, Weissman DH, Woldorff MG, Mangun GR (2006) Pre-target activity in visual cortex predicts behavioral performance on spatial and feature attention tasks. *Brain research* 1080:63-72.
- Gilad A, Meirovithz E, Leshem A, Arieli A, Slovin H (2012) Collinear stimuli induce local and cross-areal coherence in the visual cortex of behaving monkeys. *PloS one* 7:e49391.
- Gilbert CD, Das A, Ito M, Kapadia M, Westheimer G (1996) Spatial integration and cortical dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:615-622.
- Gilbert CD, Kelly JP (1975) The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *The Journal of comparative neurology* 163:81-105.
- Gilbert CD, Li W (2013) Top-down influences on visual processing. *Nature reviews Neuroscience* 14:350-363.
- Gilbert CD, Sigman M (2007) Brain states: top-down influences in sensory processing. *Neuron* 54:677-696.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120-125.

- Gilbert CD, Wiesel TN (1983) Clustered intrinsic connections in cat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3:1116-1133.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1989) Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9:2432-2442.
- Grinvald A, Anglister L, Freeman JA, Hildesheim R, Manker A (1984) Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain. *Nature* 308:848-850.
- Grinvald ADS, A Shmuel, D.E Glaser, I Vanzetta, E Shtoyerman, H Slovin, C Wijnbergen, R Hildesheim, A Sterkin, A Arieli (1999) In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics. U Windhorst, H Johansson (Eds), *Modern Techniques in Neuroscience Research*, Springer-Verlag, Heidelberg 894–969.
- Guitton D, Mandl G (1974) The effect of frontal eye field stimulation on unit activity in the superior colliculus of the cat. *Brain research* 68:330-334.
- Gutierrez C, Yaun A, Cusick CG (1995) Neurochemical subdivisions of the inferior pulvinar in macaque monkeys. *The Journal of comparative neurology* 363:545-562.
- Handel BF, Haarmeier T, Jensen O (2011) Alpha oscillations correlate with the successful inhibition of unattended stimuli. *Journal of cognitive neuroscience* 23:2494-2502.
- Hanslmayr S, Aslan A, Staudigl T, Klimesch W, Herrmann CS, Bauml KH (2007) Prestimulus oscillations predict visual perception performance between and within subjects. *NeuroImage* 37:1465-1473.
- Hanslmayr S, Gross J, Klimesch W, Shapiro KL (2011) The role of alpha oscillations in temporal attention. *Brain research reviews* 67:331-343.
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior*. New York: Wiley & Sons.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J (1987) Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:1503-1519.
- Hickey TL, Guillery RW (1974) An autoradiographic study of retinogeniculate pathways in the cat and the fox. *The Journal of comparative neurology* 156:239-253.
- Hirsch E (2012) *Histologische Untersuchungen und Rekonstruktion des posteromedialen lateralen suprasylvianischen Areals bei der Katze*. Bachelorthesis Fachbereich Biologie TU Darmstadt.
- Hirsch JA, Gilbert CD (1991) Synaptic physiology of horizontal connections in the cat's visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1800-1809.
- Hopfinger JB, Buonocore MH, Mangun GR (2000) The neural mechanisms of top-down attentional control. *Nature neuroscience* 3:284-291.
- Huang L, Chen X, Shou T (2004) Spatial frequency-dependent feedback of visual cortical area 21a modulating functional orientation column maps in areas 17 and 18 of the cat. *Brain research* 998:194-201.
- Hubel DH (1989) *Auge und Gehirn: Neurobiologie des Sehens*. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of physiology* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN (1963) Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *The Journal of physiology* 165:559-568.
- Hubel DH, Wiesel TN, Stryker MP (1978) Anatomical demonstration of orientation columns in macaque monkey. *The Journal of comparative neurology* 177:361-380.
- Hupe JM, James AC, Payne BR, Lomber SG, Girard P, Bullier J (1998) Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons. *Nature* 394:784-787.
- Hyvarinen A (1999) Fast and robust fixed-point algorithms for independent component analysis. *IEEE transactions on neural networks / a publication of the IEEE Neural Networks Council* 10:626-634.

- Illing RB, Wassle H (1981) The retinal projection to the thalamus in the cat: a quantitative investigation and a comparison with the retinotectal pathway. *The Journal of comparative neurology* 202:265-285.
- Inagaki S, Katura T, Kawaguchi H, Song WJ (2003) Isolation of neural activities from respiratory and heartbeat noises for in vivo optical recording in guinea pigs using independent component analysis. *Neuroscience letters* 352:9-12.
- Jensen O, Bonnefond M, VanRullen R (2012) An oscillatory mechanism for prioritizing salient unattended stimuli. *Trends in cognitive sciences* 16:200-206.
- Jensen O, Gelfand J, Kounios J, Lisman JE (2002) Oscillations in the alpha band (9-12 Hz) increase with memory load during retention in a short-term memory task. *Cerebral cortex* 12:877-882.
- Jensen O, Mazaheri A (2010) Shaping functional architecture by oscillatory alpha activity: gating by inhibition. *Frontiers in human neuroscience* 4:186.
- Jones SR, Pinto DJ, Kaper TJ, Kopell N (2000) Alpha-frequency rhythms desynchronize over long cortical distances: a modeling study. *Journal of computational neuroscience* 9:271-291.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000) *Principles of Neural Science* (Fourth Edition). McGraw-Hill Medical.
- Kastner S, Pinsk MA, De Weerd P, Desimone R, Ungerleider LG (1999) Increased activity in human visual cortex during directed attention in the absence of visual stimulation. *Neuron* 22:751-761.
- Kastner S, Ungerleider LG (2000) Mechanisms of visual attention in the human cortex. *Annual review of neuroscience* 23:315-341.
- Kelly SP, Lalor EC, Reilly RB, Foxe JJ (2006) Increases in alpha oscillatory power reflect an active retinotopic mechanism for distracter suppression during sustained visuospatial attention. *Journal of neurophysiology* 95:3844-3851.
- Kenet T, Bibitchkov D, Tsodyks M, Grinvald A, Arieli A (2003) Spontaneously emerging cortical representations of visual attributes. *Nature* 425:954-956.
- Kennedy C, Des Rosiers MH, Sakurada O, Shinohara M, Reivich M, Jehle JW, Sokoloff L (1976) Metabolic mapping of the primary visual system of the monkey by means of the autoradiographic [¹⁴C]deoxyglucose technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:4230-4234.
- Klimesch W, Doppelmayr M, Russegger H, Pachinger T, Schwaiger J (1998) Induced alpha band power changes in the human EEG and attention. *Neuroscience letters* 244:73-76.
- Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S (2007) EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain research reviews* 53:63-88.
- Kohonen T (2001) *Kohonen Self-organizing maps*. Springer Verlag.
- Kolmac CI, Mitrofanis J (1998) Patterns of brainstem projection to the thalamic reticular nucleus. *The Journal of comparative neurology* 396:531-543.
- Lamme VA, Super H, Spekreijse H (1998) Feedforward, horizontal, and feedback processing in the visual cortex. *Current opinion in neurobiology* 8:529-535.
- Lange J, Oostenveld R, Fries P (2013) Reduced occipital alpha power indexes enhanced excitability rather than improved visual perception. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:3212-3220.
- Lee TS, Mumford D (2003) Hierarchical Bayesian inference in the visual cortex. *Journal of the Optical Society of America A, Optics, image science, and vision* 20:1434-1448.
- Lehky SR, Maunsell JH (1996) No binocular rivalry in the LGN of alert macaque monkeys. *Vision research* 36:1225-1234.
- Lehtela L, Salmelin R, Hari R (1997) Evidence for reactive magnetic 10-Hz rhythm in the human auditory cortex. *Neuroscience letters* 222:111-114.
- Llinas R, Jahnsen H (1982) Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature* 297:406-408.
- Lomber SG, Payne BR, Cornwell P, Long KD (1996) Perceptual and cognitive visual functions of parietal and temporal cortices in the cat. *Cerebral cortex* 6:673-695.

- Lopes da Silva F (1991) Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 79:81-93.
- Lorincz ML, Kekesi KA, Juhasz G, Crunelli V, Hughes SW (2009) Temporal framing of thalamic relay-mode firing by phasic inhibition during the alpha rhythm. *Neuron* 63:683-696.
- Luck SJ, Chelazzi L, Hillyard SA, Desimone R (1997) Neural mechanisms of spatial selective attention in areas V1, V2, and V4 of macaque visual cortex. *Journal of neurophysiology* 77:24-42.
- Luebke JI <http://www.bumc.bu.edu/anatneuro/research/cellular-neurobiology/>. Boston University Scholl of Medicine , Anatomy & Neurobiology, 650 Albany ST.
- Luebke JI, Weaver CM, Rocher AB, Rodriguez A, Crimins JL, Dickstein DL, Wearne SL, Hof PR (2010) Dendritic vulnerability in neurodegenerative disease: insights from analyses of cortical pyramidal neurons in transgenic mouse models. *Brain structure & function* 214:181-199.
- Maeda S, Inagaki S, Kawaguchi H, Song WJ (2001) Separation of signal and noise from in vivo optical recording in Guinea pigs using independent component analysis. *Neuroscience letters* 302:137-140.
- Martin KA, Whitteridge D (1984) Form, function and intracortical projections of spiny neurones in the striate visual cortex of the cat. *The Journal of physiology* 353:463-504.
- Mathewson KE, Gratton G, Fabiani M, Beck DM, Ro T (2009) To see or not to see: prestimulus alpha phase predicts visual awareness. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:2725-2732.
- Mathewson KE, Lleras A, Beck DM, Fabiani M, Ro T, Gratton G (2011) Pulsed out of awareness: EEG alpha oscillations represent a pulsed-inhibition of ongoing cortical processing. *Frontiers in psychology* 2:99.
- Mathewson KE, Prudhomme C, Fabiani M, Beck DM, Lleras A, Gratton G (2012) Making waves in the stream of consciousness: entraining oscillations in EEG alpha and fluctuations in visual awareness with rhythmic visual stimulation. *Journal of cognitive neuroscience* 24:2321-2333.
- McAlonan K, Cavanaugh J, Wurtz RH (2006) Attentional modulation of thalamic reticular neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:4444-4450.
- McAlonan K, Cavanaugh J, Wurtz RH (2008) Guarding the gateway to cortex with attention in visual thalamus. *Nature* 456:391-394.
- McHaffie JG, Thomson CM, Stein BE (2001) Corticotectal and corticostriatal projections from the frontal eye fields of the cat: an anatomical examination using WGA-HRP. *Somatosensory & motor research* 18:117-130.
- McMains SA, Fehd HM, Emmanouil TA, Kastner S (2007) Mechanisms of feature- and space-based attention: response modulation and baseline increases. *Journal of neurophysiology* 98:2110-2121.
- Mehta AD, Ulbert I, Schroeder CE (2000) Intermodal selective attention in monkeys. I: distribution and timing of effects across visual areas. *Cerebral cortex* 10:343-358.
- Meirovithz E, Ayzenshtat I, Bonne YS, Itzhack R, Werner-Reiss U, Slovini H (2010) Population response to contextual influences in the primary visual cortex. *Cerebral cortex* 20:1293-1304.
- Meredith MA (1999) The frontal eye fields target multisensory neurons in cat superior colliculus. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 128:460-470.
- Montero VM (2000) Attentional activation of the visual thalamic reticular nucleus depends on 'top-down' inputs from the primary visual cortex via corticogeniculate pathways. *Brain research* 864:95-104.
- Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of neurophysiology* 20:408-434.
- Mukhametov LM, Rizzolatti G, Tradardi V (1970) Spontaneous activity of neurones of nucleus reticularis thalami in freely moving cats. *The Journal of physiology* 210:651-667.

- Muller NG, Kleinschmidt A (2003) Dynamic interaction of object- and space-based attention in retinotopic visual areas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:9812-9816.
- Niessing J, Ebisch B, Schmidt KE, Niessing M, Singer W, Galuske RA (2005) Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* 309:948-951.
- Nowak LG, James AC, Bullier J (1997) Corticocortical connections between visual areas 17 and 18a of the rat studied in vitro: spatial and temporal organisation of functional synaptic responses. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 117:219-241.
- O'Connor DH, Fukui MM, Pinsk MA, Kastner S (2002) Attention modulates responses in the human lateral geniculate nucleus. *Nature neuroscience* 5:1203-1209.
- Ohki K, Chung S, Kara P, Hubener M, Bonhoeffer T, Reid RC (2006) Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels. *Nature* 442:925-928.
- Onat S, Konig P, Jancke D (2011) Natural scene evoked population dynamics across cat primary visual cortex captured with voltage-sensitive dye imaging. *Cerebral cortex* 21:2542-2554.
- Osipova D, Hermes D, Jensen O (2008) Gamma power is phase-locked to posterior alpha activity. *PloS one* 3:e3990.
- Payne B, Peters a (2001) *The Cat Primary Visual Cortex*. Academic Pr Inc.
- Payne BR (1993) Evidence for visual cortical area homologs in cat and macaque monkey. *Cerebral cortex* 3:1-25.
- Payne BR, Berman N (1983) Functional organization of neurons in cat striate cortex: variations in preferred orientation and orientation selectivity with receptive-field type, ocular dominance, and location in visual-field map. *Journal of neurophysiology* 49:1051-1072.
- Payne BR, Lomber SG (2003) Quantitative analyses of principal and secondary compound parieto-occipital feedback pathways in cat. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 152:420-433.
- Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B (2003) Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:1298-1309.
- Petersen SE, Robinson DL, Keys W (1985) Pulvinar nuclei of the behaving rhesus monkey: visual responses and their modulation. *Journal of neurophysiology* 54:867-886.
- Pfurtscheller G (2001) Functional brain imaging based on ERD/ERS. *Vision research* 41:1257-1260.
- Pfurtscheller G (2003) Induced oscillations in the alpha band: functional meaning. *Epilepsia* 44 Suppl 12:2-8.
- Pfurtscheller G, Neuper C, Krausz G (2000) Functional dissociation of lower and upper frequency mu rhythms in relation to voluntary limb movement. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 111:1873-1879.
- Purushothaman G, Marion R, Li K, Casagrande VA (2012) Gating and control of primary visual cortex by pulvinar. *Nature neuroscience* 15:905-912.
- Rao RP, Ballard DH (1999) Predictive coding in the visual cortex: a functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nature neuroscience* 2:79-87.
- Ratzlaff EH, Grinvald A (1991) A tandem-lens epifluorescence macroscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *Journal of neuroscience methods* 36:127-137.
- Reinonso-Suarez F (1961) *Topographischer Hirnatlas der Katze*. Darmstadt E Merck AG.
- Reynolds JH, Pasternak T, Desimone R (2000) Attention increases sensitivity of V4 neurons. *Neuron* 26:703-714.
- Robinson DL, Petersen SE, Keys W (1986) Saccade-related and visual activities in the pulvinar nuclei of the behaving rhesus monkey. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 62:625-634.

- Romei V, Brodbeck V, Michel C, Amedi A, Pascual-Leone A, Thut G (2008a) Spontaneous fluctuations in posterior alpha-band EEG activity reflect variability in excitability of human visual areas. *Cerebral cortex* 18:2010-2018.
- Romei V, Gross J, Thut G (2010) On the role of prestimulus alpha rhythms over occipito-parietal areas in visual input regulation: correlation or causation? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:8692-8697.
- Romei V, Rihs T, Brodbeck V, Thut G (2008b) Resting electroencephalogram alpha-power over posterior sites indexes baseline visual cortex excitability. *Neuroreport* 19:203-208.
- Romeis B (1948) *Mikroskopische Technik*, München.
- Rudolph KK, Pasternak T (1996) Lesions in cat lateral suprasylvian cortex affect the perception of complex motion. *Cerebral cortex* 6:814-822.
- Saalmann YB, Kastner S (2011) Cognitive and perceptual functions of the visual thalamus. *Neuron* 71:209-223.
- Salinas E, Thier P (2000) Gain modulation: a major computational principle of the central nervous system. *Neuron* 27:15-21.
- Salzberg BM, Davila HV, Cohen LB (1973) Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* 246:508-509.
- Salzberg BM, Grinvald A, Cohen LB, Davila HV, Ross WN (1977) Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system: simultaneous monitoring of several neurons. *Journal of neurophysiology* 40:1281-1291.
- Sauseng P, Klimesch W, Stadler W, Schabus M, Doppelmayr M, Hanslmayr S, Gruber WR, Birbaumer N (2005) A shift of visual spatial attention is selectively associated with human EEG alpha activity. *The European journal of neuroscience* 22:2917-2926.
- Scheeringa R, Mazaheri A, Bojak I, Norris DG, Kleinschmidt A (2011) Modulation of visually evoked cortical FMRI responses by phase of ongoing occipital alpha oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:3813-3820.
- Scheeringa R, Petersson KM, Kleinschmidt A, Jensen O, Bastiaansen MC (2012) EEG alpha power modulation of FMRI resting-state connectivity. *Brain connectivity* 2:254-264.
- Schoffelen JM, Oostenveld R, Fries P (2005) Neuronal coherence as a mechanism of effective corticospinal interaction. *Science* 308:111-113.
- Schroeder CE, Lakatos P (2009) Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection. *Trends in neurosciences* 32:9-18.
- Serences JT, Yantis S (2006) Selective visual attention and perceptual coherence. *Trends in cognitive sciences* 10:38-45.
- Sestieri C, Sylvester CM, Jack AI, d'Avossa G, Shulman GL, Corbetta M (2008) Independence of anticipatory signals for spatial attention from number of nontarget stimuli in the visual field. *Journal of neurophysiology* 100:829-838.
- Shadlen MN, Newsome WT (1994) Noise, neural codes and cortical organization. *Current opinion in neurobiology* 4:569-579.
- Shen W, Liang Z, Chen X, Shou T (2006) Posteromedial lateral suprasylvian motion area modulates direction but not orientation preference in area 17 of cats. *Neuroscience* 142:905-916.
- Sherman SM (2001) A wake-up call from the thalamus. *Nature neuroscience* 4:344-346.
- Sherman SM (2004) Interneurons and triadic circuitry of the thalamus. *Trends in neurosciences* 27:670-675.
- Sherman SM, Koch C (1986) The control of retinogeniculate transmission in the mammalian lateral geniculate nucleus. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 63:1-20.
- Shipp S (2003) The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 358:1605-1624.
- Shmuel A, Grinvald A (1996) Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:6945-6964.

- Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, Toledo Y, Hildesheim R, Grinvald A (1999) Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron* 24:791-802.
- Sillito AM, Cudeiro J, Jones HE (2006) Always returning: feedback and sensory processing in visual cortex and thalamus. *Trends in neurosciences* 29:307-316.
- Sillito AM, Jones HE (2002) Corticothalamic interactions in the transfer of visual information. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 357:1739-1752.
- Singer W (1977) Control of thalamic transmission by corticofugal and ascending reticular pathways in the visual system. *Physiological reviews* 57:386-420.
- Snyder AC, Foxe JJ (2010) Anticipatory attentional suppression of visual features indexed by oscillatory alpha-band power increases: a high-density electrical mapping study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4024-4032.
- Softky WR, Koch C (1993) The highly irregular firing of cortical cells is inconsistent with temporal integration of random EPSPs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:334-350.
- Spaak E, Bonnefond M, Maier A, Leopold DA, Jensen O (2012) Layer-specific entrainment of gamma-band neural activity by the alpha rhythm in monkey visual cortex. *Current biology : CB* 22:2313-2318.
- Stam CJ, Pijn JP, Suffczynski P, Lopes da Silva FH (1999) Dynamics of the human alpha rhythm: evidence for non-linearity? *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 110:1801-1813.
- Stepniewska I, Kaas JH (1997) Architectonic subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. *Visual neuroscience* 14:1043-1060.
- Steriade M, Domich L, Oakson G, Deschenes M (1987) The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *Journal of neurophysiology* 57:260-273.
- Steriade M, Llinas RR (1988) The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiological reviews* 68:649-742.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-685.
- Swindale NV, Grinvald A, Shmuel A (2003) The spatial pattern of response magnitude and selectivity for orientation and direction in cat visual cortex. *Cerebral cortex* 13:225-238.
- Symonds LL, Rosenquist AC (1984) Corticocortical connections among visual areas in the cat. *The Journal of comparative neurology* 229:1-38.
- Tasaki I, Watanabe A, Sandlin R, Carnay L (1968) Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61:883-888.
- Thatcher RW, McAlaster R, Lester M, Horst RL, Cantor DS (1983) Hemispheric EEG asymmetries related to cognitive functioning in children. In A Perecuman, *Cognitive Processing in the Right Hemisphere* (pp 125–145) New York: Academic Press.
- Thut G, Nietzel A, Brandt SA, Pascual-Leone A (2006) Alpha-band electroencephalographic activity over occipital cortex indexes visuospatial attention bias and predicts visual target detection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:9494-9502.
- Toro C, Deuschl G, Thatcher R, Sato S, Kufta C, Hallett M (1994) Event-related desynchronization and movement-related cortical potentials on the ECoG and EEG. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 93:380-389.
- Tretter F, Cynader M, Singer W (1975) Cat parastriate cortex: a primary or secondary visual area. *Journal of neurophysiology* 38:1099-1113.
- Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A, Arieli A (1999) Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science* 286:1943-1946.

- Tsumoto T, Suzuki DA (1976) Effects of frontal eye field stimulation upon activities of the lateral geniculate body of the cat. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 25:291-306.
- Tuladhar AM, ter Huurne N, Schoffelen JM, Maris E, Oostenveld R, Jensen O (2007) Parieto-occipital sources account for the increase in alpha activity with working memory load. *Human brain mapping* 28:785-792.
- Tusa RJ, Palmer LA, Rosenquist AC (1978) The retinotopic organization of area 17 (striate cortex) in the cat. *The Journal of comparative neurology* 177:213-235.
- Tusa RJ, Rosenquist AC, Palmer LA (1979) Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *The Journal of comparative neurology* 185:657-678.
- Ungerleider LG, Christensen CA (1977) Pulvinar lesions in monkeys produce abnormal eye movements during visual discrimination training. *Brain research* 136:189-196.
- Vajda I, Lankheet MJ, Borghuis BG, van de Grind WA (2004) Dynamics of directional selectivity in area 18 and PMLS of the cat. *Cerebral cortex* 14:759-767.
- van Dijk H, Schoffelen JM, Oostenveld R, Jensen O (2008) Prestimulus oscillatory activity in the alpha band predicts visual discrimination ability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:1816-1823.
- Van Horn SC, Erisir A, Sherman SM (2000) Relative distribution of synapses in the A-laminae of the lateral geniculate nucleus of the cat. *The Journal of comparative neurology* 416:509-520.
- van Vreeswijk C, Sompolinsky H (1996) Chaos in neuronal networks with balanced excitatory and inhibitory activity. *Science* 274:1724-1726.
- Womelsdorf T, Fries P, Mitra PP, Desimone R (2006) Gamma-band synchronization in visual cortex predicts speed of change detection. *Nature* 439:733-736.
- Worden MS, Foxe JJ, Wang N, Simpson GV (2000) Anticipatory biasing of visuospatial attention indexed by retinotopically specific alpha-band electroencephalography increases over occipital cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:RC63.
- Yamagishi N, Callan DE, Goda N, Anderson SJ, Yoshida Y, Kawato M (2003) Attentional modulation of oscillatory activity in human visual cortex. *NeuroImage* 20:98-113.
- Zikopoulos B, Barbas H (2006) Prefrontal projections to the thalamic reticular nucleus form a unique circuit for attentional mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7348-7361.

9 Publikationen

Wibral M, Lizier JT, Vögler S, Priesemann V, Galuske R (2014) Local active information storage as a tool to understand distributed neural information processing. *Frontiers in neuroinformatics* 8:1.

10

Lebenslauf

Name	Sebastian Vögler
Geburtsdatum	27.04.1982
Geburtsort	Kassel

Ausbildung	
04/2009 – 09/2013	Promotionsstudent an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ralf Galuske im Bereich der Systemischen Neurophysiologie, in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main
07/2008 – 03/2009	Diplomarbeit an der TU Darmstadt, Arbeitsgruppe Systemische Neurophysiologie mit dem Thema: „Morphometrische Studien zur zellulären Organisation der humanen Amygdala“
10/2003 – 03/2009	Studium der Biologie an der TU Darmstadt mit dem Abschluss Diplom
10/2002 – 10/2003	Studium der Elektrotechnik (2 Semester) an der TU Darmstadt
06/2001	Abitur Wigbert Gymnasium Hünfeld
Beruflicher Hintergrund	
10/2013 - andauernd	Juniorproduktmanager Taurus Pharma GmbH Bad Homburg
04/2009 – 09/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Darmstadt im Bereich der Systemischen Neurophysiologie, Fachbereich Biologie

11

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf A. W. Galuske! Er hat meine wissenschaftliche Laufbahn schon von Anfang an begleitet und mir immer durch kompetente Beratung zur Seite gestanden. Aus unserer gemeinsamen Zeit ist nicht nur eine Dissertation, sondern auch eine Freundschaft entstanden. Ohne Ihn wäre es nie zu dieser Arbeit gekommen, denn ohne seine Überredungskünste nach der Diplomarbeit hätte ich vermutlich gar nicht promoviert. Danke! ☺

Herrn Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken, insbesondere weil er sich nicht gescheut hat, nach der Diplomarbeit nun schon wieder ein Werk von mir zu lesen.

Herrn Prof. Dr. Warzecha und Herrn Prof. Dr. Wiemeyer danke ich herzlich dafür, dass sie sich so spontan dazu bereit erklärt haben, diese Arbeit zu bewerten und meine Prüfer zu werden.

Herrn Prof. Dr. Jochen Triesch, Herrn Prof. Dr. Constantin Rothkopf und Dr. Manu Punnen John danke ich für das gemeinsame Projekt ICA.

Mein besonderer Dank gilt meiner Büro Ehe Fabian Hoffmann, der sich mit mir zusammen durch Matlab, Experimente und Praktika gewühlt hat und mir auch in der Mensa stets ein treuer Begleiter war.

Ich danke Kirsten Wehner und Linda Wiesinger für jegliche Organisation und Hilfestellung im Unialltag und natürlich auch für die gute Stimmung im Kaffeeraum.

Ich danke allen anderen Mitgliedern unserer AG für die fruchtbaren Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit! Danke liebe AG!

Ich danke meinen Studenten Daniel, Eva und Lilli für die gemeinsame Arbeit an meinem Projekt.

Ich danke all meinen Freunden, die nun endlich sagen dürfen: „Sebbo, jetzt haben wir es rum!“

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir im Hintergrund immer den Rücken frei gehalten haben und die sich nach dem Ende meiner Doktorandenzeit noch mehr gesehnt haben, als ich. Für die moralische Unterstützung danke ich natürlich auch meinen Schwestern inklusive allen Zuwächsen in der Familie. Oma und Opa, auch euch lieben Dank!!!

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Franzi, die mir in allen Phasen dieser Arbeit und darüber hinaus eine liebevolle und treue Wegbegleiterin war. Da dieses Kapitel nun abgeschlossen ist, freue ich mich nun mit Dir alle neuen Kapitel in unserem gemeinsamen Leben zu beginnen.

12

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....